

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIAN CRISTINA SPIER

**AVALIAÇÃO EM TEMPO REAL COM MULTI DETECTORES DE REAÇÕES DE  
MODIFICAÇÃO QUÍMICA EM XILOGLUCANA**

Curitiba

2016

VIVIAN CRISTINA SPIER

**AVALIAÇÃO EM TEMPO REAL COM MULTI DETECTORES DE REAÇÕES DE  
MODIFICAÇÃO QUÍMICA EM XILOGLUCANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química da Universidade  
Federal do Paraná como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rita Sierakowski

Curitiba

2016

---

SP755a

Spier, Vivian Cristina

Avaliação em tempo real com multi detectores de reações de modificação química em xiloglucana / Vivian Cristina Spier. – Curitiba, 2016.

109 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

Orientador: Rilton Alves de Freitas.

Coorientador: Maria Rita Sierakowski.

1. Reações química. 2. Xiloglucana. 3. Endoglucanase. 4. Cromatografia.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves de. III. Sierakowski, Maria Rita. IV. Título.

CDD: 541.394

---

## TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Ata da Centésima Quadragésima  
Segunda Defesa Pública de Tese de  
Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Química da Universidade  
Federal do Paraná, realizada em  
26/02/2016.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis, às treze horas e trinta minutos, no Auditório do CEHPAR/UFPR, foi realizada a sessão pública de defesa de Tese de Doutorado da aluna **Vivian Cristina Spier**. Estavam presentes, além da candidata, os membros da Comissão Examinadora: o Sr. Presidente Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, a Prof. Dr. Edvani Curti Muniz, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Ferreira César Oliveira e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Riegel Vidotti. Após a apresentação do trabalho da doutoranda, intitulado **“Avaliação em tempo real com multidetectores de reações de modificação em xiloglucanas”**, a candidata foi arguida pela Comissão. Após reunião, a Comissão decidiu por unanimidade pela aprovação da doutoranda, condicionada às alterações na tese sugeridas pela banca. O resultado foi então comunicado à candidata e aos presentes na sessão pública. A seguir, o Sr. Presidente declarou encerrada a sessão, da qual eu, Marcelino Câmara, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, lavrei a presente ata que, depois de aprovada, será assinada por mim, pelo Presidente e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas  
Presidente - Dep. de Química – UFPR

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira  
Dep. de Bioquímica - UFPR

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Riegel Vidotti  
Dep. de Química – UFPR

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz  
Dep. de Química – UEM

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Ferreira César Oliveira  
Dep. de Química – UFPR

Marcelino Câmara

Dedico,

À minha mãe,

que no meio do caminho ficou sem palavras,  
mas continuou me dizendo que deveria ir sempre mais longe.

Ao meu pai,

que da sua maneira peculiar,  
sempre teve orgulho de mim.

Ao meu irmão,

que incondicionalmente me ajudou mais do que qualquer um,  
sem ele não teria conseguido.

A Deus,

a quem entreguei toda minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo, me guiando, me protegendo, derramando suas bênçãos sobre mim, desde e para sempre.

À minha família, meus pais, meu irmão e minha cunhada, pelo apoio, incentivo, compreensão e amor depositados em mim durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas pela confiança, orientação e ensinamentos, sua paixão pelo saber foi um dos catalisadores da minha inspiração.

A Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski por sua paixão pela ciência e pesquisa, sem seu esforço e dedicação, esse trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Wayne F. Reed pelas valiosas contribuições e discussões durante meu estágio sanduiche na *Tulane University*.

Ao Departamento de Bioquímica/UFPR por disponibilizar os equipamentos para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática, de novo especial a Profa. Dra. Joana Lea Meira Silveira.

Aos colegas do Biopol pelos vários *helps*, amizade, incentivo e apoio todos os dias, durante os últimos 4 anos.

A todos os professores do Departamento de Química que de uma maneira ou outra contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

*Bote fé e a vida terá um sabor novo,*

*terá uma bússola que indica a direção.*

*Bote esperança e todos os seus dias serão iluminados*

*e o seu horizonte já não será escuro, mas luminoso.*

*Bote amor e a sua existência será como uma casa*

*construída sobre a rocha,*

*o seu caminho será alegre,*

*porque encontrará muitos amigos*

*que caminham com você.*

*Bote fé.*

*Bote esperança.*

*Bote amor.*

**Papa Francisco**

**(JMJ - Rio 2013)**

*Viajar e desbravar o desconhecido me faz enxergar  
quem eu sou, me faz querer ir mais longe.  
Foi distante de casa, dos amigos, da família, que  
consegui olhar para mim mesma com outros olhos.  
Não foi fácil voltar, também não foi fácil ficar,  
mais difícil ainda foi partir...  
mas eu precisava ir!  
A pior fuga não está em sair... mas em ficar.  
Sair para poder desnudar minha alma, ver minha  
pequenez e a grandiosidade que me completa.  
E assim, distante de tudo, sem o ruído que interfere  
a minha vida, consegui ver quem eu sou.  
Porque acreditar que somos insubstituíveis é a  
maior de todas as zonas de conforto  
e por isso sair se fez necessário.  
Vivemos fugindo do mundo para dentro do nosso mundinho,  
porque dentro desse mundinho, somos alguém e  
porque fora dele somos ninguém.  
Só podemos descobrir quem somos, quando  
tomamos consciência da nossa insignificância,  
quando descobrimos que não somos ninguém  
e que sem ninguém podemos nos perder.  
Mas melhor do que partir foi poder voltar.  
Voltar para os braços daqueles que amo,  
compartilhar a vida e também uma xícara de café.  
Para sair de mim mesma e ser uma pessoa diferente...  
eu precisava ir.  
Mas voltei com a visão renovada, com o espírito  
expandido.  
Mas o mais importante... voltei com a certeza de  
que o meu lugar é onde está o meu coração.*

Vivian C Spier – New Orleans, 28 de setembro de 2015



## RESUMO

As hidrólises das xiloglucanas das sementes de *Tamarindus indica* (XGT) e de *Hymenaea courbaril* (XGJ) com endoglucanase (EGII) foram analisadas em tempo real utilizando detectores de espalhamento de luz estático e viscosimetria (TDSLS-vis). Foram avaliadas três diferentes concentrações da enzima. Para ambas as amostras de xiloglucana, houve uma diminuição na massa molar aparente, na viscosidade intrínseca, no comprimento de persistência e no raio de giro imediatamente após a adição da enzima. A constante de velocidade da reação foi dependente da concentração de EGII. Uma cinética de primeira ordem foi observada por 140 min, formando oligossacarídeos de 1 a 3 unidades. A galactose distante duas posições da glucose não substituída modula a ação da enzima e a hidrólise completa ocorreu em 24 h. Os resultados demonstraram, pela primeira vez, a degradação em tempo real da xiloglucana, sua composição macromolecular e oligossacarídeos formados durante o processo de hidrólise com EGII. A oxidação seletiva da XGT utilizando *TEMPO* como catalisador foi monitorada em um sistema ACOMP acoplado a multi detectores. Foram avaliadas a oxidação em diferentes condições de pH (9, 7 e 5), na ausência do catalisador *TEMPO* e em diferentes concentrações do catalisador. O grau de oxidação foi maior em pH 9 e foi observada degradação do material em todas as condições estudadas, de forma mais acentuada na ausência do catalisador *TEMPO*, e a constante de velocidade foi dependente da concentração do catalisador. As espécies reativas de oxigênio foram responsáveis pela degradação na cadeia polimérica e o *TEMPO* além de catalisador tem a função de proteger, como “molécula de sacrifício”, o polissacarídeo da degradação. É a primeira vez em que é atribuída ao *TEMPO* uma função diferente das funções clássicas de catalisador da reação de oxidação. Tal observação só pode ser realizada a partir da avaliação em tempo real dos experimentos na presença e na ausência do catalisador. Comparativamente aos detectores de espalhamento de luz, o detector viscosimétrico mostrou-se eficiente para análises químicas em tempo real para polissacarídeos, por não ser sensível as interferências de agregados moleculares, tanto em reações enzimáticas quanto em reações de oxidação seletiva com *TEMPO*.

**Palavras chave:** Xiloglucana, Endoglucanase (EGII), N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (*TEMPO*), espalhamento de luz estático dependente do tempo (TDSLS), cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), monitoramento *on-line* contínuo e automático de reações de polimerização (ACOMP), mistura contínua automática ACM.

## ABSTRACT

The hydrolysis of xyloglucan from *Tamarindus indica* (XGT) and *Hymenaea courbaril* (XGJ) seeds with endoglucanase (EGII) was monitored in real time using time-dependent static light scattering and viscometer (TDSLS-vis), performed at three different enzyme concentrations. For both samples there was a decrease in the apparent weight average molecular weight, intrinsic viscosity, persistence length, gyration radius, immediately after the addition of the enzyme and the rate constant was dependent on the EGII concentration. The first-order kinetics was observed for oligosaccharide digestion up to 140 min, forming oligomers composed of 1 to 3 units. Galactose at two positions far from the non-substituted glucose modulated the action of EGII, and the complete hydrolysis of XG oligomers occurred after 24 hours. The results demonstrate for the first time the real-time degradation of xyloglucan and the macromolecular and oligosaccharide composition during the EGII hydrolysis process. The selective oxidation of XGT mediated by *TEMPO* as a catalyst was evaluated using ACOMP coupled a multi detector train system. Oxidation were evaluated at different pH conditions (9, 7 and 5), without *TEMPO* catalyst and different concentrations of catalyst. The degree of oxidation was higher at pH 9 and polysaccharide degradation was observed in both conditions, it was higher without *TEMPO*. The first-order kinetics was dependent on the concentration of the catalyst. Reactive oxygen species were responsible for polymer degradation and besides catalyst; *TEMPO* has, also, the function to protect the polysaccharide from degradation. It is the first time which *TEMPO* is assigned to a different function of the classic functions, as a catalyst of the oxidation reaction. This observation can only be demonstrated by real-time degradation of xyloglucan in experiments with and without *TEMPO*. Compared to light scattering detector, the viscosity detector showed promise for chemical analyzes in real time to polysaccharides, by reducing interference from molecular aggregates, both enzymatic reactions as for selective oxidation reactions.

**Key-words:** *Xyloglucan, Endoglucanase (EGII), N-oxil-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO), time dependent static light scattering (TDSLS), high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC), Size Exclusion Chromatography (SEC), Automatic Continuous Online Monitoring Reactions (ACOMP), Automatic Continuous Mixing (ACM).*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS XXLG E XXXXG DE XILOGLUCANA OBTIDOS DA SEMENTES DE JATOBÁ (XGJ).....	22
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANA: XXG (A), XXXG (B), XLXG (C), XXLG (D), XLLG (E), XXXXG (F), XXXLG (G), XLXXG (H) E XXLXG (I).....	23
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM EGII DO POLISSACARÍDEO FORMANDO OLIGOSSACARÍDEOS.....	27
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DO CATALISADOR DURANTE REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DO POLISSACARÍDEO COM SISTEMA TEMPO/NaClO/NaBr EM MEIO ALCALINO.....	30
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO DO POLISSACARÍDEO A CARBOXILATO COM CATALISADOR SELETIVO TEMPO EM MEIO ALCALINO.....	31
FIGURA 6 -	ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS TDSLS-vis PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS XGT E XGJ COM EGII.....	43
FIGURA 7 -	ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS ACOMP PARA AS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA XGT COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	44
FIGURA 8 -	ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE ACM DOS PRODUTOS FINAIS OXIDADOS DE XGT.....	48
FIGURA 9 -	SINAL DO DETECTOR DE RI OBTIDO NOS EXPERIMENTOS DE ACM PARA VERIFICAR O EFEITO DO POLIELETROLITO SOBRE OS PRODUTOS OXIDADOS DE XGT.....	48
FIGURA 10 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DE SEC DAS AMOSTRAS DE XGT ( <b>A</b> ) E XGJ ( <b>B</b> ) NATIVA (t = 0 min) E PRODUTO FINAL HIDROLISADO (t = 140 min) COM EGII 0,009 U.mL <sup>-1</sup> UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTATICO A 90° (SLS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).....	52

FIGURA 11 -	HIDRÓLISE EM TEMPO REAL DA XGT <b>(A)</b> E XGJ <b>(B)</b> COM EGII $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ USANDO DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A $90^\circ$ (SLS), DETECTOR VISCOSIMÉTRICO (vis) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI). AS SETAS INDICAM O MOMENTO DA ADIÇÃO DA ENZIMA EGII.....	53
FIGURA 12 -	PARÂMETROS MACROMOLECULARES OBTIDOS EM TEMPO REAL DA HIDRÓLISE DE XGT (A) E XGJ (B) COM EGII $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ . OS TRIANGULOS VERMELHOS MOSTRAM OS VALORES DE MASSA MOLAR OBTIDOS POR ANÁLISES DE SEC.....	56
FIGURA 13 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XGT <b>(A)</b> E XGJ <b>(B)</b> HIDROLISADOS COM EGII $0,012 \text{ U.mL}^{-1}$ DURANTE 24 h OBTIDOS POR HPAEC.....	58
FIGURA 14 -	RESULTADO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (MMOL COOH/g DE POLÍMERO) OBTIDO POR TITULAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO DE XGT EM pH 9, pH 7, pH 5 E SEM O CATALISADOR <i>TEMPO</i> A pH 9.....	60
FIGURA 15 -	RESULTADOS DE MASSA MOLAR MÉDIA EM MASSA ( $M_w$ ) E RAIOS DE GIRO ( $R_g^*$ ) CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE ZIMM DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi pH9</sub> <b>(A)</b> , XGT <sub>oxi pH7</sub> <b>(B)</b> , XGT <sub>oxi pH5</sub> <b>(C)</b> E XGT <sub>sem TEMPO</sub> <b>(D)</b> EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.....	64
FIGURA 16 -	RESULTADOS DE VISCOSIDADE REDUZIDA (ViscoRed) E RAIOS DE GIRO ( $R_g^{**}$ ) CALCULADO POR FLORY-FOX DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi pH9</sub> <b>(A)</b> , XGT <sub>oxi pH7</sub> <b>(B)</b> , XGT <sub>oxi pH5</sub> <b>(C)</b> E XGT <sub>sem TEMPO</sub> <b>(D)</b> EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.....	66
FIGURA 17 -	RESULTADOS DO RAIOS HIDRODINÂMICOS ( $R_h$ ) E ROTAÇÃO ÓTICA ( $[\alpha]$ ) DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi pH9</sub> <b>(A)</b> , XGT <sub>oxi pH7</sub> <b>(B)</b> , XGT <sub>oxi pH5</sub> <b>(C)</b> E XGT <sub>sem TEMPO</sub> <b>(D)</b> EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.....	67
FIGURA 18 -	DADOS DE VISCOSIDADE (Visco) E SINAL BRUTO DO ESPALHAMENTO DE LUZ A $90^\circ$ (SLS) DO PRODUTO OXIDADO XGT <sub>oxi pH9</sub> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO NOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	69
FIGURA 19 -	RESULTADOS DE $K_c/R_\theta$ A $90^\circ$ DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi pH9</sub> , XGT <sub>oxi pH7</sub> , XGT <sub>oxi pH5</sub> E XGT <sub>sem TEMPO</sub> VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	71

FIGURA 20 -	RESULTADOS DE VISCOSIDADE REDUZIDA DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi</sub> pH9, XGT <sub>oxi</sub> pH7, XGT <sub>oxi</sub> pH5 E XGT <sub>sem</sub> TEMPO VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	72
FIGURA 21 -	RESULTADOS DO RAO DE GIRO ( $R_g^{**}$ ) CALCULADOS POR FLORY-FOX DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi</sub> pH9, XGT <sub>oxi</sub> pH7, XGT <sub>oxi</sub> pH5 E XGT <sub>sem</sub> TEMPO VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	73
FIGURA 22 -	RESULTADOS DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL ( $A_2$ ) CALCULADOS POR FLORY-FOX DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi</sub> pH9, XGT <sub>oxi</sub> pH7, XGT <sub>oxi</sub> pH5 E XGT <sub>sem</sub> TEMPO VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	74
FIGURA 23 -	RESULTADOS DE ROTAÇÃO ÓTICA DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi</sub> pH9, XGT <sub>oxi</sub> pH7, XGT <sub>oxi</sub> pH5 E XGT <sub>sem</sub> TEMPO VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL NOS EXPERIMENTOS DE ACM.....	75
FIGURA 24 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT <sub>oxi</sub> pH9, XGT <sub>oxi</sub> pH7, XGT <sub>oxi</sub> pH5 E XGT <sub>sem</sub> TEMPO UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A 90° (SLS) <b>(A)</b> E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) <b>(B)</b> OBTIDOS POR SEC.....	77
FIGURA 25 -	RESULTADO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (MMOL COOH/g DE POLÍMERO) OBTIDO POR TITULAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO DE XGT A pH 9 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR <i>TEMPO</i> , XGT <sub>sem</sub> TEMPO, XGT <sub>0,015mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,03mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,06mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,15mol/L</sub> TEMPO <b>(A)</b> E AMPLIAÇÃO DAS CURVAS DE TITULAÇÃO PARA XGT <sub>0,03mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,06mol/L</sub> TEMPO E XGT <sub>0,15mol/L</sub> TEMPO <b>(B)</b> .....	79
FIGURA 26 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CATALISADOR <i>TEMPO</i> , XGT <sub>sem</sub> TEMPO, XGT <sub>0,015mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,03mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,06mol/L</sub> TEMPO, XGT <sub>0,15mol/L</sub> TEMPO UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A 90° (SLS) OBTIDOS POR SEC.....	81
FIGURA 27 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE $\beta$ -ELIMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEO.....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT E XGJ NATIVAS.....	49
TABELA 2 -	RESULTADOS OBTIDOS POR TDSLS-vis DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA XGT E XGJ COM EGII.....	51
TABELA 3 -	RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT E XGJ NATIVA E ALÍQUOTAS EM 10 E 140 MIN DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM EGII A $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ .....	57
TABELA 4 -	RESULTADOS OBTIDOS POR HPAEC DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XGT E XGJ HIDROLISADOS (m/m%) COM EGII $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ .....	59
TABELA 5 -	RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.....	61
TABELA 6 -	RESULTADO OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.....	62
TABELA 7 -	RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE ACM DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.....	70
TABELA 8 -	RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.....	76
TABELA 9 -	RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO A pH9 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CATALISADOR TEMPO.....	78
TABELA 10 -	RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TEMPO.....	81

## LISTA DE ABREVIATÖES E SÍMBOLOS

$\varphi_0$	-	constante de Flory-Fox
$[\alpha]$		rotação ótica
$[\eta]$	-	viscosidade intrínseca
$\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$	-	raiz quadrada da média do raio de giro
$A_2$	-	segundo coeficiente virial
ACM	-	mistura contínua automática, do inglês <i>automatic continuous mixing</i>
ACOMP	-	monitoramento <i>on-line</i> contínuo e automático de reações de polimerização, do inglês <i>automatic continuous monitoring of polymerization reactions</i>
$c^*$	-	concentração crítica
$\bar{D}$	-	dispersão (= $M_w/M_n$ )
DLS	-	espalhamento de luz dinâmico, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
$dn/dc$	-	incremento do índice de refração em função da concentração
EG	-	enzima endoglucanase
EGII	-	enzima endoglucanase tipo II
HPAEC	-	cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico, do inglês <i>high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection</i>
HPLC	-	cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>

k	-	constante de velocidade
L	-	comprimento do monômero
LALS	-	espalhamento de luz a ângulo de 7°, do inglês <i>low angle light scattering</i>
$L_p$	-	comprimento de persistência
MALLS	-	espalhamento de luz laser multi-ângulo, do inglês <i>multi-angle laser light scattering</i>
$M_w$	-	massa molar média em massa
$M_{wapp}$	-	massa molar aparente
$N_a$	-	número de Avogadro
PAD	-	detector de pulso amperométrico
RALS	-	espalhamento de luz a ângulo de 90°, do inglês <i>right angle light scattering</i>
Rec	-	recuperação
$R_g^*$	-	raio de giro obtido pela equação de Zimm
$R_g^{**}$		raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox
$R_h$	-	raio hidrodinâmico
RI	-	índice de refração, do inglês <i>refractive index</i>
RMN	-	ressonância magnética nuclear
SEC	-	cromatografia de exclusão por tamanho do inglês <i>size exclusion chromatography</i>
SLS	-	espalhamento de luz estático, do inglês <i>static light scattering</i>



TDSLS	-	espalhamento de luz estático dependente do tempo, do inglês <i>time dependent static light scattering</i>
TEMPO	-	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
UV/VIS	-	ultravioleta-visível
vis	-	viscosímetro
XG	-	xiloglucana
XGJ	-	xiloglucana de jatobá
XGT	-	xiloglucana de tamarindo

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	20
1.1.	POLISSACARÍDEOS .....	21
1.1.1.	XILOGLUCANAS .....	21
1.2.	REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO .....	25
1.2.1.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	25
1.2.2.	OXIDAÇÃO COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	29
1.3.	ANÁLISES EM TEMPO REAL .....	33
1.3.1.	MONITORAMENTO EM TEMPO REAL .....	34
1.3.2.	MISTURA CONTÍNUA AUTOMÁTICA .....	35
2.	OBJETIVOS .....	36
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1.	AMOSTRAS E REAGENTES .....	38
3.2.	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA .....	39
3.3.	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE XILOGLUCANA .....	40
3.3.1.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE .....	40
3.3.2.	OXIDAÇÃO COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	40
3.4.	MONITORAMENTO DAS REAÇÕES EM TEMPO REAL .....	41
3.4.1.	MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	42

3.4.2.	MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA OXIDAÇÃO COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	43
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS .....	45
3.5.1.	CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA .....	45
3.5.2.	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO .....	45
3.5.3.	MISTURA CONTÍNUA AUTOMÁTICA .....	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DA XILOGLUCANA .....	49
4.2.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE.....	50
4.3.	OXIDAÇÃO COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	60
4.3.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS.....	68
4.3.2.	EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	78
5.	DISCUSSÃO .....	83
5.1.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE.....	83
5.2.	OXIDAÇÃO COM CATALISADOR <i>TEMPO</i> .....	87
	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES .....	95
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
	ANEXOS .....	107

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de polissacarídeos tem atraído a atenção em vários setores industriais, como alimentos, têxtil, cuidados pessoais, operações petrolíferas, papel, tinta e revestimento, além da indústria farmacêutica e biomédica, principalmente devido à sua boa solubilidade em água, reatividade química elevada, e formação de soluções poliméricas de alta viscosidade, de baixo custo e baixa toxicidade. Na sua forma natural ou quimicamente modificada os polissacarídeos apresentam uma vasta aplicação como espessantes, modificadores reológicos e estabilizadores de emulsão (SILVEIRA E BRESOLIN, 2011).

Os processos de modificação química dos polissacarídeos não apresentam uma caracterização físico-química que permita uma discussão mais aprofundada, com um detalhamento do efeito da modificação sobre o comportamento macromolecular e hidrodinâmico, que podem ser decisivos para futuras aplicações destes polímeros em processos industriais, ou mesmo como suporte na reprodutibilidade dos resultados obtidos em pesquisas científicas utilizando polímeros naturais (LAVAZZA *et al.*, 2011).

Tanto as reações enzimáticas, como as reações de oxidação de polissacarídeos, são usualmente realizadas utilizando métodos convencionais para a caracterização dos produtos obtidos após reações de modificação química, como: cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) e cromatografia de troca aniônica (HPAEC). Entretanto, informações sobre aspectos macromoleculares e hidrodinâmicos podem ser refinadas com análises em tempo real com multi detectores fornecendo informações mais detalhadas do processo estudado.

## 1.1. POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos pertencem a mais abundante e diversificada família de polímeros naturais. A estrutura destes pode variar na sua composição química, sequência dos monossacarídeos, nas ligações glicosídicas envolvidas e massa molar. Variações nestes parâmetros podem levar a diferentes formas de estruturas químicas e de conformação, que refletem em uma vasta gama de propriedades que podem ser utilizadas em diversas áreas da indústria. Estes polímeros também têm a característica de biodegradabilidade, ajudando a preservar o meio ambiente.

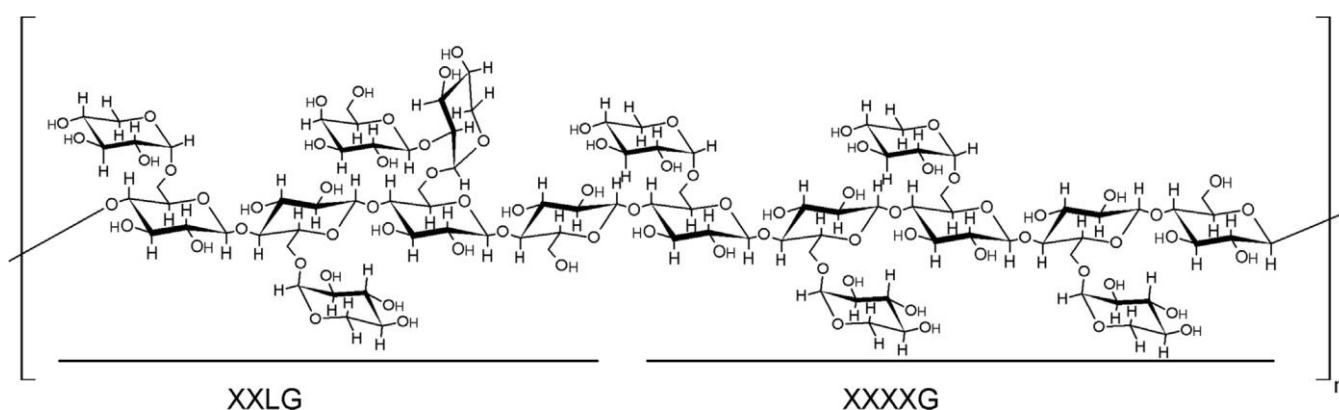
Entre os polissacarídeos de interesse industrial têm-se as xiloglucanas, que são biopolímeros neutros e constituem polissacarídeos de armazenamento e estruturais em vegetais superiores (gimnosperma e angiosperma), também definidos como vegetais que produzem flores (fanerógamos). Em termos da sua distribuição no mundo vegetal são encontradas no endosperma das sementes de várias famílias de plantas, desempenhando o papel de reserva durante a germinação, em que sofrem catabolismo para fornecer produtos de metabolismo para o crescimento da planta (LAVAZZA *et al.*, 2011, ANDRADE *et al.*, 1999).

### 1.1.1. XILOGLUCANAS

As xiloglucanas (XG) são muito importantes, pois desempenham papel estrutural na parede celular primária de vegetais superiores, bem como apresentam função de reserva em sementes de algumas espécies de dicotiledôneas. A estrutura química da XG é composta, principalmente, dos seguintes monossacarídeos: *D*-glucose, *D*-xilose e *D*-galactose. Esses monossacarídeos estão presentes em proporções de aproximadamente 4:3:1 (HAYASHI *et al.*, 1994). A estrutura da cadeia principal do biopolímero é constituída por unidades de  $\beta$ -*D*-glucopiranoose unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→4). Ocorrem substituições em O-6 por unidades de  $\alpha$ -*D*-xilopiranoose, que

pode também ser substituída em O-2 por  $\beta$ -D-galactopiranosose (CARPITA e MCCANN, 2000, HAYASHI *et al.*, 1994). Além disso, nas XG presentes na parede celular primária, as  $\beta$ -D-galactopiranososes podem ser substituídas em O-2 por  $\alpha$ -L-fucopiranososes. Dessa forma, elas são chamadas de XG fucosiladas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A **Figura 1** mostra a representação esquemática da estrutura de cadeia de XG de semente de jatobá (XGJ).

As propriedades estruturais, físicas e biológicas de XG das sementes de tamarindo e jatobá têm sido extensivamente estudadas (FREITAS *et al.*, 2015; MAHAJAN, DESHMUKH, 2015; GAUCHE *et al.*, 2013; LUCYSZYN *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2003; DE LIMA E BUCKERIDGE, 2001; BUCKERIDGE *et al.*, 1997; LIMA-NISHIMURA *et al.*, 1995).

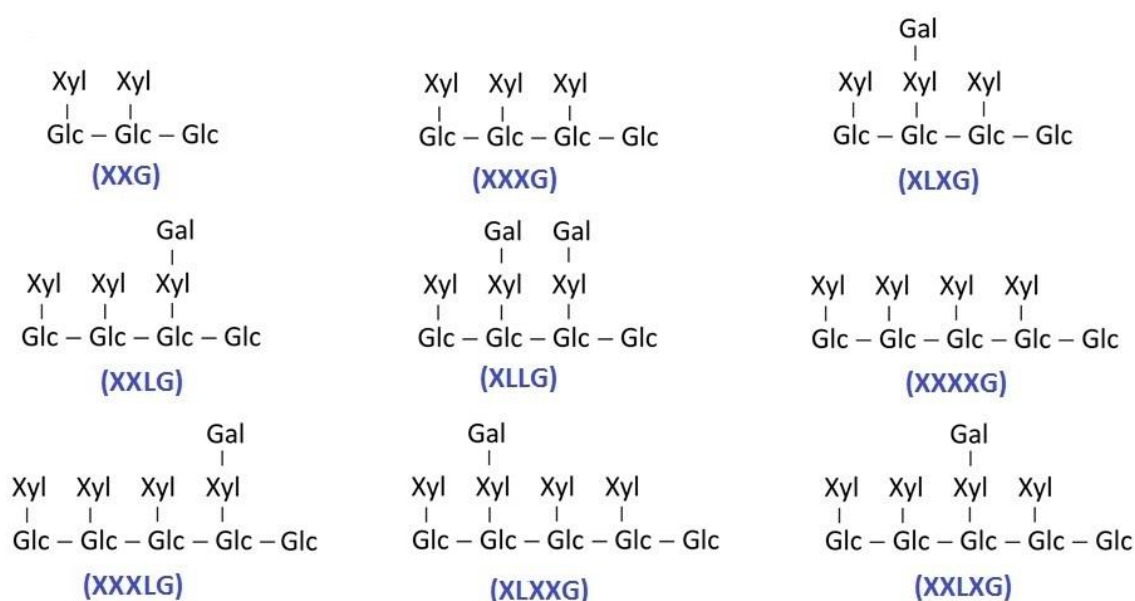


**FIGURA 1.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS XXLG E XXXXG DE XILOGLUCANA OBTIDOS DA SEMENTES DE JATOBÁ (XGJ).  
**FONTE:** FREITAS *et al.* (2015).

Fry *et al.* (1993) propuseram uma nomenclatura para oligossacarídeos de XG. A letra G representa unidades de glucose da cadeia principal que não possuem ramificação. Para as outras glucoses, outras letras representam a substituição na cadeia. Por exemplo, se uma xilose estiver ligada à glucose, a unidade recebe a letra X. Se houver uma galactose ligada à xilose e está estiver ligada na glucose, a unidade recebe a letra L.

As estruturas de oligossacarídeos das amostras de XG, mostradas na **Figura 2**, obtidas das sementes de tamarindo (XGT) e de jatobá (XGJ) indicam

que, mesmo diferentes fontes de XG, têm um padrão semelhante estrutural de oligossacarídeos, sendo compostas quase inteiramente de quatro oligômeros: XXXG (B), XLXG (C), XXLG (D) e LLLG (E), que diferem no número de cadeias laterais de galactose e no tamanho dos oligossacarídeos, com uma nova série de oligômeros XXXXG (F) para as sementes de jatobá (ARRUDA *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2003; SILVA-TINÉ, DE LIMA, BUCKERIDGE, 2003; DE LIMA E BUCKERIDGE, 2001; TINÉ, CORTELAZZO E BUCKERIDGE, 2000; BUCKERIDGE *et al.*, 1997).



**FIGURA 2.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANA: XXG (A), XXXG (B), XLXG (C), XXLG (D), LLLG (E), XXXXG (F), XXXLG (G), XLXXG (H) E XXLXG (I).

**FONTE:** SPIER *et al.* (2015).

Uma vantagem dos polissacarídeos de reserva em sementes, comparados aos de parede celular é a facilidade de extração. Os de reserva são encontrados em grande quantidade, e são obtidos por extração aquosa e praticamente livres de contaminantes, com alto rendimento formando soluções viscosas em baixas concentrações (HAYASHI *et al.*, 1994).

Por estes motivos, nesta tese foram selecionados tais polissacarídeos e os resultados deste estudo será apresentado. A seguir alguns estudos realizados com xiloglucana, e que serviram de referência para este projeto.

Picout *et al.* (2003) observaram que, em solução aquosa, a XG forma soluções viscosas e relativamente estáveis a mudanças de pH. XG isolada de sementes de *H. courbaril*, inicialmente identificadas por Lima-Nishimura *et al.* (1995) apresentaram viscosidade intrínseca de  $850 \text{ mL.g}^{-1}$ , utilizando água como solvente. Como outros polissacarídeos, em solução diluída, a XGJ apresentou comportamento Newtoniano e, em altas concentrações ( $>10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), comportamento pseudoplástico (MARTIN *et al.*, 2003).

A presença de agregados moleculares em solução de XGJ pode ser minimizada com aquecimento a  $85^\circ\text{C}$  por 2 h, com redução da massa molar, viscosidade intrínseca e raio de giro devido a processos de desagregação molecular (FREITAS *et al.* 2005). Adicionalmente, os autores identificaram que a presença de uma série única de oligossacarídeos na estrutura da XGJ induzia a formação de uma molécula mais rígida quando comparada com a de XGT.

Arruda *et al.* (2015) extraíram XGJ e avaliaram a estrutura do polissacarídeo, que apresentou composição de glucose, xilose e galactose nas proporções de 4:3:1 respectivamente. As análises reológicas mostraram comportamento de soluções viscoelásticas da XGJ nativa em concentrações de 0,5 e 1,0% (m/v). Foram obtidos filmes de XGJ e testes biológicos mostraram que este não apresenta atividade antimicrobiana e hemolítica, além de não apresentar toxicidade, demonstrando potencial para aplicações biotecnológicas deste biopolímero.

Freitas *et al.* (2015) observaram a formação de duas redes poliméricas em XGJ: a rede transiente, observada em altas frequências, com tempo de relaxamento muito baixo, e uma rede “quasi-permanente” observada a baixos valores de frequência e com tempo de relaxamento elevado. Ambas as redes na XGJ foram observadas em concentrações semidiluídas, ou seja, acima da concentração crítica ( $c^*$ ).

As reações de modificação química das XGs, objeto de estudo deste trabalho, podem contribuir para elucidação estrutural e melhorar propriedades macromoleculares e hidrodinâmicas, ampliando a gama de aplicação destes polissacarídeos e ampliando interesse na exploração dessa matéria-prima de origem biológica em processos industriais e biotecnológicos.



## 1.2. REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO

### 1.2.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A reação de hidrólise enzimática de polissacarídeo é realizada por meio de enzimas que atuam como catalisadores para clivar ligações específicas do polissacarídeo, e vários trabalhos são descritos na literatura sobre esta temática (NEGAHDAR, DELIDOVICH, PALKOVITS, 2016; JUNG *et al.*, 2015; DAMÁSIO *et al.*, 2012, FREITAS *et al.*, 2011; BUSATO *et al.*, 2009; DE ALCÂNTARA *et al.*, 2006, OLIVEIRA JUNIOR, BRAGA e BUCKERIDGE, 2006; TINÉ *et al.*, 2006, GANTER, SABBI, REED, 2001; VINCKEN *et al.*, 1996).

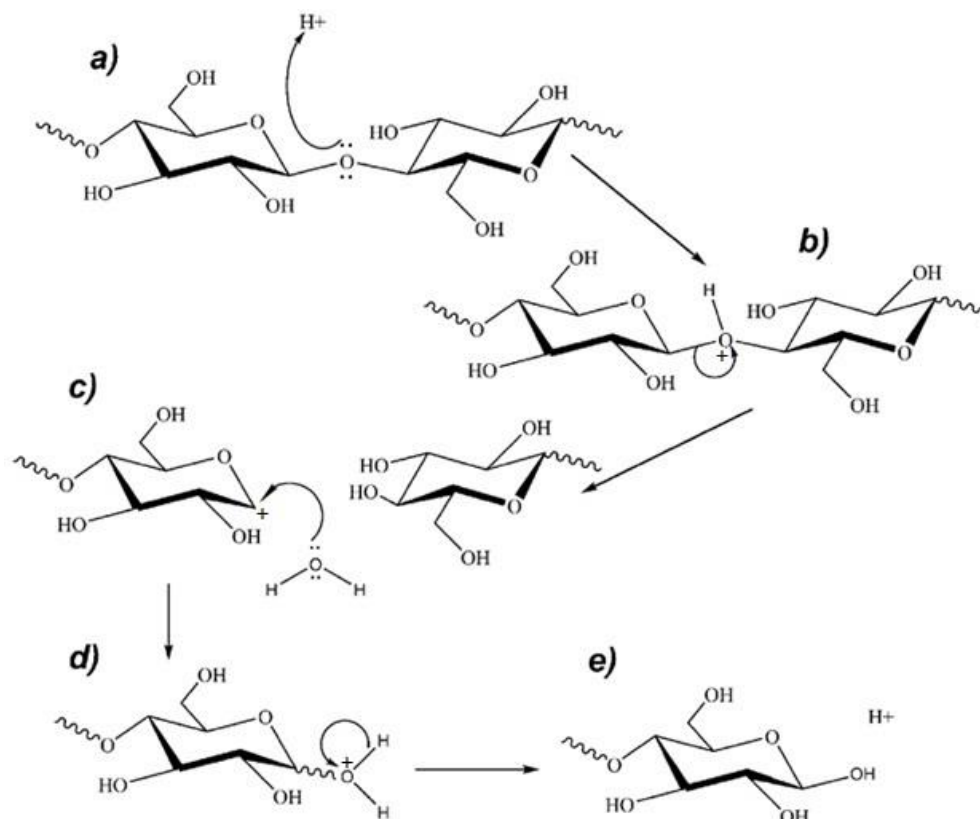
A enzima utilizada neste trabalho é denominada de endoglucanase ou celulase (EG) sendo responsável por hidrolisar randomicamente a cadeia polimérica. O ponto de atuação deste tipo de enzima se dá nas unidades de  $\beta$ -D-glucose não substituída, clivando a ligação glicosídica (1 $\rightarrow$ 4), formando os blocos de oligossacarídeos. Existem basicamente dois tipos de mecanismo para a hidrólise: retenção e inversão (WITHERS, RUPITZ e STREET, 1988; DIN *et al.*, 1995).

O mecanismo de retenção consiste em um mecanismos de dupla substituição, que leva à retenção da configuração do carbono anomérico do anel de carboidrato envolvido na catálise, ou seja, se na cadeia polimérica a glucose encontra-se com configuração  $\beta$ , após a catálise essa molécula manterá sua configuração  $\beta$ . O sítio ativo das enzimas não permite a adsorção da molécula de água, então o nucleófilo (um carboxilato na enzima) ataca o carbono anomérico, enquanto o par de elétrons da ligação glicosídica remove um próton do grupo carboxila, nesta etapa forma-se um intermediário glicosil-enzima. O aminoácido desprotonado ataca uma molécula de água no meio, formando uma hidroxila que ataca o carbono anomérico e libera o carboidrato com a configuração original (anômero  $\beta$ ) (WITHERS, RUPITZ e STREET, 1988; DIN *et al.*, 1995). Portanto, a enzima EGII, usada neste trabalho, ocorre através deste mecanismo.

O mecanismo de inversão, ao contrário, gera a mudança da configuração  $\beta$  da unidade de glucose presente na cadeia polimérica, para sua forma  $\alpha$ , após hidrólise. Neste mecanismo, o sítio ativo da enzima promove a ionização de uma molécula de água que ataca o centro anomérico diretamente, numa reação de catálise ácido-base. Para a hidrólise ocorrer, tanto o substrato quanto a molécula de água, necessitam estar posicionados entre os resíduos de aminoácidos ácidos da enzima (DIN *et al.*, 1995).

O mecanismo da hidrólise ocorre basicamente em dois fenômenos distintos: a adsorção da enzima na superfície do substrato e a hidrólise do polissacarídeo. E podem ocorrer as seguintes etapas: difusão do complexo celulásico na solução polimérica, adsorção do complexo celulásico nos sítios poliméricos disponíveis, formação do complexo ativo celulase-polímero, difusão dos produtos de hidrólise do sítio celulase-polímero para solução, dessorção do complexo celulásico do polímero hidrolisado (AWAFO, 2000). A etapa inicial de adsorção da enzima no polímero é bastante rápida, levando em torno de 1-3 minutos, porém, não ocorre a adsorção física na sua totalidade, isso se deve a impedimento estérico, tanto devido à conformação do polímero quanto da enzima (RAD e YAZDANPARAST, 1998).

A **Figura 3** mostra de forma esquemática o processo de hidrólise da cadeia de XG, que consiste numa reação ácido-base do oxigênio da ligação glicosídica com  $H^+$ . O próton é proveniente do sítio catalítico da enzima que doa o  $H^+$  para a reação (**a**), ocorre a quebra da ligação glicosídica formando um OH na extremidade do carbono não redutor, liberando um oligossacarídeo (**b**), e há a formação de carbocátion no carbono anomérico (**c**). A água do meio faz um ataque ao carbocátion (**d**) que gera outro oligossacarídeo, com regeneração do catalisador  $H^+$  (**e**) (OGEDA e PETRI, 2010).



**FIGURA 3.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM EGII DO POLISSACARÍDEO FORMANDO OLIGOSSACARÍDEOS.  
**FONTE:** ADAPTADO DE OGEDA E PETRI (2010).

Freitas *et al.* (2011) observaram que, durante o tratamento enzimático de XGJ, há formação de interações intermoleculares, que afetaram o comprimento de persistência ( $L_p$ ) das moléculas de XG durante a degalactosilação. Assim, os autores observaram que a formação de agregados, e não a mudança conformacional, foi a responsável pela gelificação da XGJ. Busato *et al.* (2009) avaliaram o comportamento da XGJ após o tratamento enzimático com  $\beta$ -galactosidasas e observaram que uma redução de 51% das unidades de galactose induziu a formação de um gel termo reversível.

Oliveira Junior, Braga e Buckeridge (2006) estudaram o isolamento de oligossacarídeos da XG de dicotiledôneas através da hidrólise enzimática por cromatografia de troca aniônica (HPAEC). Para tal trabalho, os polímeros foram extraídos a partir de sementes de copaíba (*Copaifera longsdorffii*) e suspensões celulares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sendo hidrolisados com endoglucanase (EG) para obtenção dos oligossacarídeos de XG. Os resultados

obtidos mostraram que a técnica de cromatografia de troca aniônica foi eficiente para purificação dos oligossacarídeos, apresentando oligômeros dos tipos XLLG e XXXG com grau de pureza próximo a 90%, e do tipo XXFG próximo de 80%. Tiné *et al.* (2006) procederam a hidrólise da xiloglucana com *endo-β*-glucanase de *Trichoderma*, para formação dos oligossacarídeos e posterior caracterização da estrutura fina do polissacarídeo.

Ganter, Sabbi, Reed (2001) realizaram a degalactosilação de galactomananas através de hidrólise enzimática, utilizando enzimas  $\alpha$ -galactosidase, e despolimerização da cadeia principal utilizando  $\beta$ -mannanase e avaliaram através da técnica de espalhamento de luz estático em tempo real os produtos formados.

Vincken *et al.* (1996) pesquisaram a degradação da XG presentes na maçã com endoglucanase. Após a reação, os oligossacarídeos obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas, como: cromatografia de troca aniônica, espectrometria de massa e análise de monossacarídeos. O polímero em questão, segundo o estudo, é composto pelos oligossacarídeos: XXFG e XLFG, XG, XXG, FG e dois blocos de oligossacarídeos contendo fucose.

As reações de hidrólise enzimática são amplamente utilizadas em processos industriais em diversas aplicações biotecnológicas. Na indústria têxtil as enzimas são utilizadas para dar melhor acabamento aos tecidos, tornando-os mais lisos e macios. A indústria de bebidas utiliza enzimas na produção de sucos de frutas facilitando sua extração e nos processos de vinificação onde a degradação enzimática libera flavorizante melhorando o aroma e o sabor do vinho. Na fabricação de detergentes, proporcionam maior limpeza e menor degradação dos tecidos e na indústria de polpa e papel tornam o papel mais branco e liso. A utilização de enzimas também tem sido aplicada no processo de produção de etanol a partir de resíduos vegetais (MARTINS *et al.*, 2008; GRIGOREVSKI DE LIMA *et al.*, 2005; WRIGHT, WYMAN, GROCHMANN, 1988).

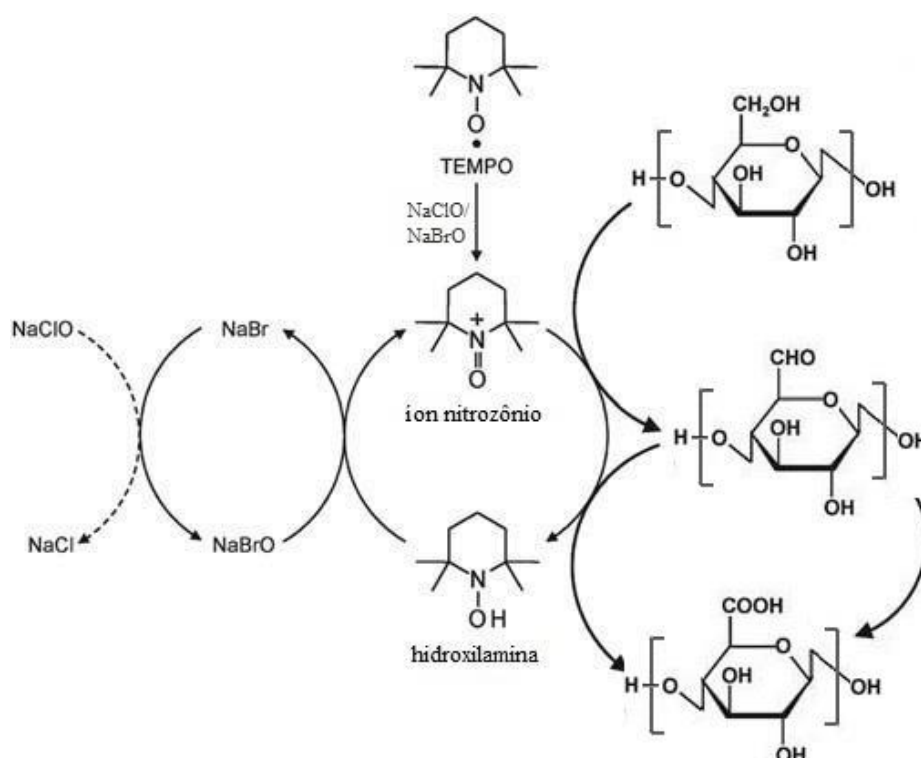
Além das reações supracitadas de hidrólise enzimática, outros tipos de processos para modificação química de polissacarídeos são bastante explorados e relatados na literatura, e a oxidação química de polissacarídeo é outra estratégia utilizada para modificação de polissacarídeos.

### 1.2.2. OXIDAÇÃO COM CATALISADOR *TEMPO*

O N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (*TEMPO*) vem sendo amplamente utilizado em reações de oxidação de polissacarídeos. Sierakowski *et al.* (2000) utilizaram o catalisador *TEMPO* para geração de modificações seletivas em galactomananas, com a formação de aldeído no C-6 e posterior alquilação e a oxidação do aldeído a carboxilato. A técnica de oxidação seletiva utilizada por Sierakowski foi inicialmente descrita por de-Nooy *et al.* (1995a; 1995b; 1996) como um método para a oxidação seletiva em polissacarídeos hidrossolúveis utilizando hipoclorito de sódio, brometo de sódio e *TEMPO* em quantidades catalíticas, onde este funciona como agente oxidante frente ao polissacarídeo.

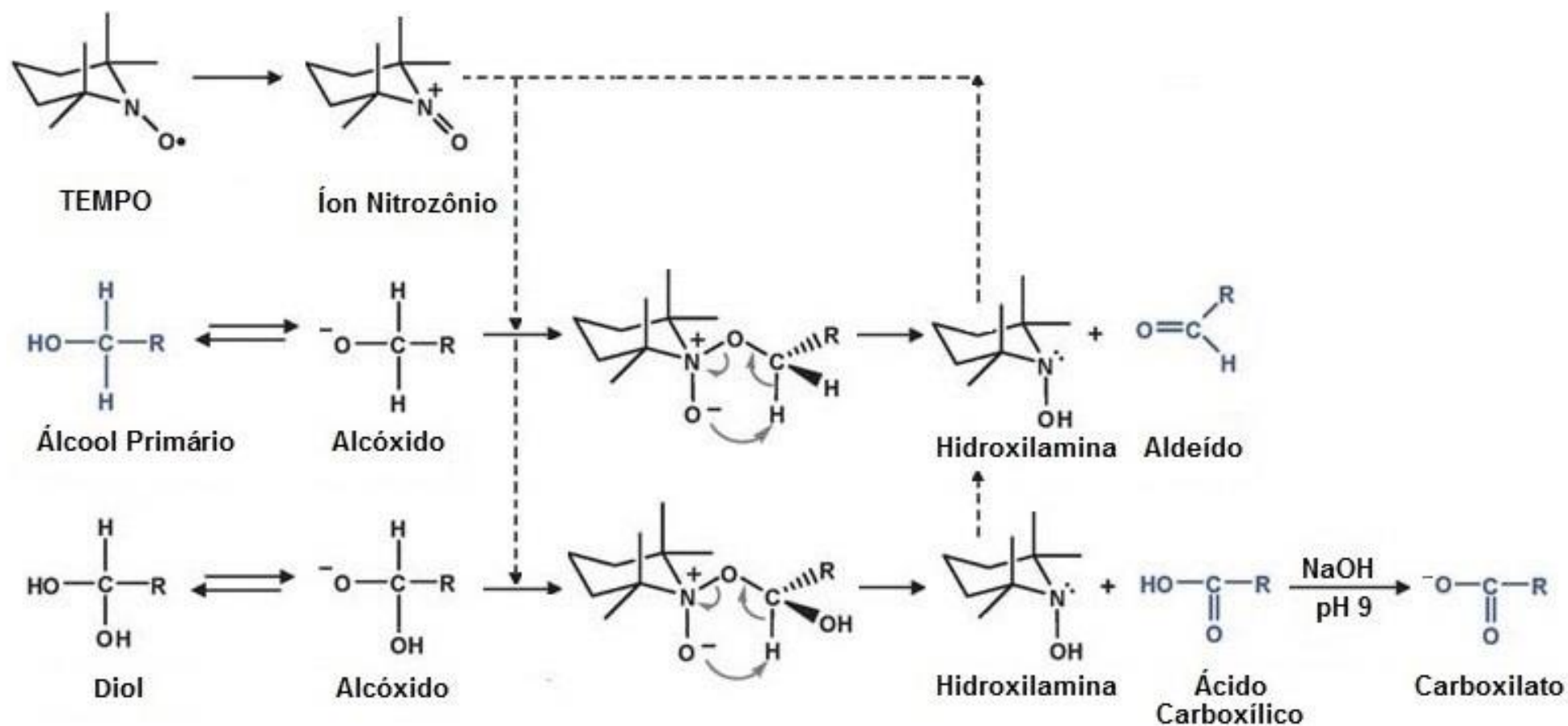
A reação catalisada pelo *TEMPO* é capaz de oxidar álcoois primários em condições brandas e com tempo reacional reduzido. Uma grande vantagem na utilização do *TEMPO* como catalisador de oxidação, é a sua estabilidade química mesmo em presença de ar, luz ou umidade, podendo ser estocado e utilizado sem necessidade de condições especiais, o que representa vantagem sobre um grande número de catalisadores de oxidação (KATO, MATSUO, ISOGAI, 2003; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000, 2002; BRAGD, BESEMER, VAN BEKKUM, 2000; de-NOOY *et al.*, 1995a, 1995b, 1996).

O ciclo do catalisador é mostrado na **Figura 4** onde no sistema *TEMPO*/NaClO/NaBr, o hipoclorito de sódio oxida o NaBr a NaBrO. O catalisador *TEMPO* é oxidado pelas espécies reativas de oxigênio (NaClO/NaBrO) formando o íon nitrozônio. O íon nitrozônio oxida sequencialmente o álcool primário do carboidrato a aldeído e a ácido carboxílico, formando hidroxilamina, que é re-oxidada a íon nitrozônio pelas espécies reativas de oxigênio, fechando o ciclo do catalisador.



**FIGURA 4.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DO CATALISADOR DURANTE REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DO POLISSACARÍDEO COM SISTEMA *TEMPO/NaClO/NaBr* EM MEIO ALCALINO.  
**FONTE:** ADAPTADO DE ISOGAI, SAITO E FUKUZUMI (2011).

A **Figura 5** mostra um esquema da reação de oxidação, onde a partir do álcool primário do carboidrato a carboxilato forma-se um poliânion. No sistema *TEMPO/NaClO/NaBr* o *TEMPO* é oxidado pelas espécies reativas de oxigênio ( $\text{NaClO/NaBrO}$ ) a íon nitrozônio. As hidroxilas primárias (C-6) em meio alcalino formam alcóxidos que reagem com íon nitrozônio formando o aldeído no polissacarídeo e reduzindo o catalisador a hidroxilamina. O catalisador é regenerado para a continuação da reação, o aldeído formado sofre uma reação de adição com a água do meio, formando um diol germinal, que reage com o íon nitrozônio sendo oxidado a ácido carboxílico, reduzindo o catalisador a hidroxilamina. Para manter o pH do meio é adicionado  $\text{NaOH}$  que reage com o ácido urônico gerando carboxilato.



**FIGURA 5.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO DO POLISSACARÍDEO A CARBOXILATO COM CATALISADOR SELETIVO *TEMPO* EM MEIO ALCALINO.

**FONTE:** ADAPTADO DE ISOGAI, SAITO E FUKUZUMI (2011).

O processo de oxidação pode ser efetuado em meio básico ou ácido. Porém, em condições básicas os álcoois primários são oxidados preferencialmente, conforme observado nos trabalhos de de-Nooy *et al.* (1995a, 1995b, 1996), Sierakowski *et al.* (2000) e Bragd, Besemer e Van Bakkum (2000) que realizaram a reação nesse meio obtiveram alto grau de oxidação.

Watanabe *et al.* (2014) utilizaram o sistema 4-acetamida-TEMPO/NaClO/NaClO<sub>2</sub> em água, pH 4,7 e 35°C para obter uma variedade de Goma curdlana oxidada preferencialmente no C-6, variando o tempo de reação e a quantidade de reagentes. Os resultados mostraram que o aumento da quantidade de reagente e o longo tempo de reação causou uma despolimerização do polissacarídeo durante o processo de oxidação.

De Souza *et al.* (2011) realizaram a oxidação com TEMPO da galactomanana de *Caesalpinia ferrea* para gerar derivados aniônicos e anfifílicos. As reações mostraram seletividade em relação às hidroxilas primárias confirmadas por RMN e observaram uma diminuição da massa molar dos produtos obtidos, indicando a presença de polímeros com diferentes estados de agregação e considerando, também, uma possível  $\beta$ -eliminação.

Jó *et al.* (2009) realizaram a caracterização química e físico-química de XG nativas e oxidadas com TEMPO das sementes de copaífera e tamarindo para o desenvolvimento de nanoestruturas para aplicação como filmes finos para imobilização de biomoléculas e concluíram que a XG forma nanoesferas que serviram para o encapsulamento da camptotecina, um antineoplásico, a estrutura formada foi capaz de produzir um encapsulamento eficiente e de prolongar a liberação de fármaco.

Cunha *et al.* (2007) estudaram a goma do cajueiro, um polissacarídeo exsudado da árvore *Anacardium occidentale*, este foi oxidado com TEMPO, e observou-se que o teor de ácido urônico da goma nativa era de 7,2% e aumentou para 36% após a reação. O grau de oxidação calculado foi de 68% e análises de ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram que a oxidação ocorreu preferencialmente nos carbonos primários das unidades de galactose. A diferença entre os valores de viscosidade da goma nativa e produto oxidado indicou que ocorreu degradação no polissacarídeo formado.



Freitas *et al.* (2004) investigaram o efeito de níveis de oxidação na estrutura, conformação e propriedades térmicas da XGJ e observaram uma redução na massa molar e que a introdução de unidades de ácido urônicos formados no processo oxidativo altera a conformação do polissacarídeo. Constataram que a cinética de degradação térmica é diretamente dependente do nível de oxidação, ou seja, com o aumento do nível de oxidação aumenta-se proporcionalmente a energia de ativação e a constante de velocidade no início do processo de degradação.

A oxidação de polissacarídeos utilizando o catalisador TEMPO é geralmente realizada em meio alcalino. No entanto, existem relatos na literatura sobre o uso de condições em meio ácido, o que afeta diretamente a seletividade e o grau de oxidação (WATANABE *et al.*, 2014).

Em condições alcalinas mais comuns ( $\text{pH} > 9$ ), diferentes autores já relataram a redução da massa molar nas reações com polissacarídeos mediadas com sistema TEMPO/NaOCl, mesmo em baixas temperaturas (0 a 4 °C) (CUNHA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2004; SAKAKIBARA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2011). Alguns autores relatam que aumentando a concentração do NaOCl no sistema ocorre um aumento da redução de massa molar do polissacarídeo (WATANABE *et al.*, 2014; MILANOVIC *et al.*, 2012; ISOGAI, SAITO E FUKUZUMI, 2011).

### **1.3. ANÁLISES EM TEMPO REAL**

Nas últimas décadas foram desenvolvidos processos para monitoramento em tempo real de reações químicas, sendo aplicadas em estudos de polimerização, estimativas para aumento de escala de processos envolvendo polímeros, no controle de processo em larga escala, no monitoramento de agregados e/ou formação de sistemas micelares uni ou multifásicos (emulsões) e nas modificações poliméricas (MCFAUL, DRENSKI, REED, 2014; DRENSKI *et al.*, 2013; ENOHNYAKET *et al.*, 2007; ALB *et al.*, 2006; GIZ *et al.*, 2002;

CHAUVIN *et al.*, 2002; GANTER, SABBI, REED, 2001; FLORENZANO, STRELITZKI, REED, 1998)

### 1.3.1. MONITORAMENTO EM TEMPO REAL

O monitoramento *on-line* contínuo e automático de reações de polimerização (ACOMP – *Automatic Continuous Monitoring of Polymerization reactions*) é realizado com fluxo contínuo de soluções diluídas de polímero a partir do reator através de diferentes detectores como: viscosímetro, espalhamento de luz multi ângulo, detector de índice de refração, detector UV/Vis. Com isso, são obtidos dados para caracterização polimérica como massa molar média em massa e viscosidade intrínseca, a cinética de conversão do monômero e, no caso de copolímeros, a composição é determinada de forma independente ao longo da reação. Reação com radicais livres, copolimerização e polimerização em solução em sistema heterogêneo, enxerto e reticulação, modificações químicas estão entre os sistemas que podem ser estudados em tempo real (MCFAUL, DRENSKI, REED, 2014; LI *et al.*, 2010; GIZ *et al.*, 2002; CHAUVIN *et al.*, 2002; FLORENZANO, STRELITZKI, REED, 1998).

Este tipo de aplicação pode reduzir custos nos processos industriais de solubilização de polímeros, devido ao conhecimento prévio da cinética de dissolução, além de monitorar processos de agregação e formação de micelas poliméricas, polimerização ou degradação polimérica em função do tempo (DRENSKI *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2010; DRENSKI *et al.*, 2004).

As reações de modificação química dos polissacarídeos podem dar origem a diferentes conformações poliméricas, as quais refletem em diferentes propriedades, que direcionam muitas de suas aplicações industriais. Este tipo de ferramenta é bastante útil, uma vez que pode ser utilizada para monitorar alterações em tempo real da intensidade de espalhamento de luz, viscosidade, entre outros detectores (FREITAS *et al.*, 2011).

### 1.3.2. MISTURA CONTÍNUA AUTOMÁTICA

Entre as técnicas de monitoramento em tempo real das propriedades macromoleculares tem-se a mistura contínua automática ou em inglês “*Automatic Continuous Mixing*” (ACM).

Esta técnica foi desenvolvida em 2002 por Sorci e Reed para o estudo de processos em equilíbrio e quase-equilíbrio, na análise de sistemas multicomponentes (ALB *et al.*, 2004). Experimentos de ACM fornecem várias informações em tempo real como, massa molar média-massa ( $M_w$ ), segundo coeficiente virial ( $A_2$ ), raio de giro ( $R_g$ ), viscosidade intrínseca  $[\eta]_w$ , em aplicações de estudos de diluição polimérica, obtendo-se uma maior vantagem quando comparados aos processos tradicionais de Zimm, uma vez que um contínuo número de pontos pode ser obtido, reduzindo tempo de preparo das amostras, fornecendo completa informação sobre a amostra em análise (BAYLY, BROUSSEAU, REED 2002; SORCI, REED 2002; SORCI, REED, 2004; FREITAS *et al.*, 2010; SAVI-JUNIOR *et al.*, 2015).

ACM também se apresenta como uma ferramenta para estudar as interações polímero-polímero, polímero-surfactante, polímero-polieletrólitos-sais, como avaliado por Savi-Júnior *et al.* (2015) que utilizou a técnica para verificar a transição conformacional de xantana em cadeias isoladas (hélices simples), em regime diluído e sua interação com cloreto de sódio.

Sendo assim, as técnicas para monitoramento em tempo real são excelentes ferramentas que podem auxiliar na compreensão detalhada de processos químicos, sendo estes dados confirmados e comparados com experimentos clássicos. Assim, no presente projeto é proposta a aplicação das análises em tempo real para caracterização macromolecular e hidrodinâmica de XGT e XGJ em reações enzimática com endoglucanase e oxidação seletiva com TEMPO da XGT.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar em tempo real, com auxílio de multi detectores, as reações químicas de despolimerização com catálise enzimática pela ação da endoglucanase e de oxidação seletiva com catalisador *TEMPO* de xiloglucanas, e avaliar as mudanças de comportamento macromolecular e hidrodinâmico do polímero durante os processos estudados.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Monitorar em tempo real a hidrólise enzimática de xiloglucanas das sementes de tamarindo (XGT) e jatobá (XGJ) utilizando como catalisador diferentes concentrações de enzima endoglucanase tipo II (EGII);

- Acompanhar em tempo real os parâmetros cinéticos e macromoleculares da hidrólise enzimática utilizando espalhamento de luz estático e viscosimetria (TDSLS-vis);

- Avaliar as alterações macromoleculares e hidrodinâmicas das reações de hidrólise enzimática em tempo real através da coleta de frações do reator e analisá-las por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a multi detectores;

- Caracterizar os oligossacarídeos gerados durante a reação de hidrólise enzimática por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detector de pulso amperométrico (HPAEC);

- Monitorar em tempo real a oxidação seletiva da XGT, utilizando o *TEMPO* como catalisador, em diferentes condições de pH, através de um sistema ACOMP acoplado a multi detectores;
- Avaliar o efeito da concentração do *TEMPO* sobre os parâmetros cinéticos reacionais e sobre reações paralelas de despolimerização;
- Avaliar as alterações macromoleculares e hidrodinâmicas durante a modificação química através do produto final da reação por análises de SEC e ACM acoplada a multi detectores.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. AMOSTRAS E REAGENTES

Sementes de *Tamarindus indica* para obtenção da xiloglucana de tamarindo (XGT) foram obtidas de fonte comercial, Conceição de Almeida/Bahia, Brasil. Sementes de *Hymenaea courbaril* para obtenção da xiloglucana de jatobá (XGJ) foram colhidas das árvores que crescem na Foz da Reserva Florestal de Chopin/Paraná, Brasil.

Toda a água utilizada neste trabalho foi purificada a partir de sistema de osmose reversa, modelo OS10LXE – Gehaka/BRA, associado ao sistema Milli-Q Plus *Water Purification System* – Millipore/USA.

Para a reação de hidrólise da XGT e XGJ com a enzima celulase, utilizou-se uma enzima endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EGII) de *Trichoderma longibrachiatum*, adquirida da Megazyme/IRL (Lote 80501/2012) e utilizada sem nenhuma purificação.

Para a fase móvel utilizada nas análises de HPAEC foram preparadas solução aquosa com NaOH peletizado (Sigma Aldrich/USA) e sal anidro de acetato de sódio (NaOAc) (Sigma Aldrich/USA).

Para a reação de oxidação foi utilizado o catalisador *TEMPO* (Sigma Aldrich/USA) e solução de hipoclorito de sódio 10% (m/v) (NaClO) (Sigma Aldrich/USA) e sal de brometo de sódio (NaBr) (Merck/DEU). Para interromper a reação de oxidação foi preparada uma solução etanólica de boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) com etanol 99% (Sigma Aldrich/USA).

O ajuste inicial do pH foi realizado com uma solução de HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich/USA), a titulação foi utilizado uma solução de NaOH a 0,05 mol.L<sup>-1</sup> preparada a partir de pellets de NaOH (Sigma Aldrich/USA). A concentração foi normalizada utilizando biftalato de potássio grau reagente como padrão primário e solução de fenolftaleína como indicador.

Para a purificação dos produtos oxidados, a fim de remover os reagentes e subprodutos de baixa massa molar, foram utilizadas membranas de celulose para diálise (D9402) da Sigma Aldrich/USA.

Para a fase móvel utilizada nas análises de SEC foram preparadas solução aquosa de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) e azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), ambas da Sigma Aldrich/USA.

Todas as membranas de filtração de acetato de celulose com poros de 3,0, 0,8, 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$  utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Millipore/DEU.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados sem nenhum processo de purificação.

### **3.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA XILOGLUCANA**

As sementes de tamarindo e de jatobá foram moídas, despigmentadas e deslipidificadas sobre refluxo com éter etílico em sistema *Soxhlet*. O isolamento da XG foi realizado através de extração aquosa exaustiva em *blender*, seguido de filtração em pano de *nylon*, centrifugação a 10.000 x g, 40 °C por 30 min e filtração por membrana de acetato de celulose com tamanho de poros de 3,0, 0,8, 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$ , seguido de precipitação com concentrações crescentes de etanol de 70% a 100%, para posterior secagem a vácuo a 40°C. Os polissacarídeos obtidos das sementes de *T. indica* foram denominados de XGT e os polissacarídeos obtidos das sementes de *H. courbaril* de XGJ.

### 3.3. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE XILOGLUCANA

#### 3.3.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE

As soluções de XG foram preparadas em água purificada, a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sob agitação magnética por 24 h. Após solubilização, as amostras foram filtradas sequencialmente por membranas de acetato de celulose de 0,8, 0,45 e  $0,22 \mu\text{m}$  para remoção de compostos insolúveis. Para estudar a cinética de despolimerização as amostras foram incubadas em um reator a  $40^\circ\text{C}$ , pH 6,5 e foram tratadas com diferentes concentrações de enzima EGII: 0,006, 0,009 e  $0,012 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Os experimentos em tempo real foram acompanhados conforme descrito no item 3.4.1.

#### 3.3.2. OXIDAÇÃO COM CATALISADOR *TEMPO*

As soluções de XGT foram preparadas em água purificada, a  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente. Após solubilização, foram filtradas em membrana de acetato de celulose ( $0,45 \mu\text{m}$ ). O reator contendo a solução de polímero foi resfriado a  $10^\circ\text{C}$ , com auxílio de um banho de gelo e purgada com  $\text{N}_2$  gasoso.

A reação de oxidação seletiva com o catalisador *TEMPO* foi realizada conforme descrito por de-Nooy *et al.* (1995a, 1995b, 1996) e Sierakowski *et al.* (2000, 2002).

Diferentes condições reacionais foram estudadas. Foram avaliados a oxidação da XGT em pH 9, 7 e 5. E para verificar a influência do catalisador na reação foram realizadas reações em pH 9, na ausência do catalisador *TEMPO* e reações com diferentes concentrações do catalizador, conforme descrito abaixo.



Os reagentes foram preparados adicionando  $8,61 \text{ mg.mL}^{-1}$  de NaClO 10%,  $0,077 \text{ mg.mL}^{-1}$  de NaBr e *TEMPO* nas diferentes concentrações de catalisador de 1x, 2x, 4x e 10x, sendo  $0,015$ ,  $0,030$ ,  $0,060$ ,  $0,150 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Os reagentes e o catalisador foram misturados e filtrados após total solubilização com membrana de acetado de celulose de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  e adicionado diretamente ao reator.

Após adição dos reagentes, o pH no reator foi ajustado nas diferentes condições estudadas (pH 9, 7 e 5) utilizando uma solução  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  de HCl. O pH do meio reacional foi mantido constante durante a reação de oxidação por meio de titulação utilizando uma solução aquosa  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaOH normalizada.

Ao final da reação foi adicionado ao reator o mesmo volume de uma solução alcóolica com  $\text{NaBH}_4$  a  $1,49 \text{ mg.mL}^{-1}$  e o pH da mistura foi ajustado para 7.

Os derivados formados da reação da XGT em pH 9 com *TEMPO* serão denominados de  $\text{XGT}_{\text{oxi pH9}}$  e assim sucessivamente para as demais condições de pH avaliadas:  $\text{XGT}_{\text{oxi pH7}}$  e  $\text{XGT}_{\text{oxi pH5}}$ . Para a reação sem o *TEMPO* a pH 9 de  $\text{XGT}_{\text{sem TEMPO}}$  e nas diferentes concentrações do catalisador de  $\text{XGT}_{0,015\text{mol/L TEMPO}}$ ,  $\text{XGT}_{0,03\text{mol/L TEMPO}}$ ,  $\text{XGT}_{0,06\text{mol/L TEMPO}}$ ,  $\text{XGT}_{0,15\text{mol/L TEMPO}}$ .

Os experimentos em tempo real foram realizados conforme descrito no item **3.4.2**.

### **3.4. MONITORAMENTO DAS REAÇÕES EM TEMPO REAL**

Os sistemas utilizados para monitoramento em tempo real das reações de modificação, tanto de hidrólise enzimática quanto a oxidação, consistiu na extração contínua a partir do reator do meio reacional, passando através dos detectores conectados em série conforme descrito nos itens **3.4.1** e **3.4.2**, respectivamente.

Os dados coletados foram utilizados para obtenção de parâmetros como massa molar média em massa ( $M_w$ ), massa molar aparente ( $M_{wapp}$ ), o segundo

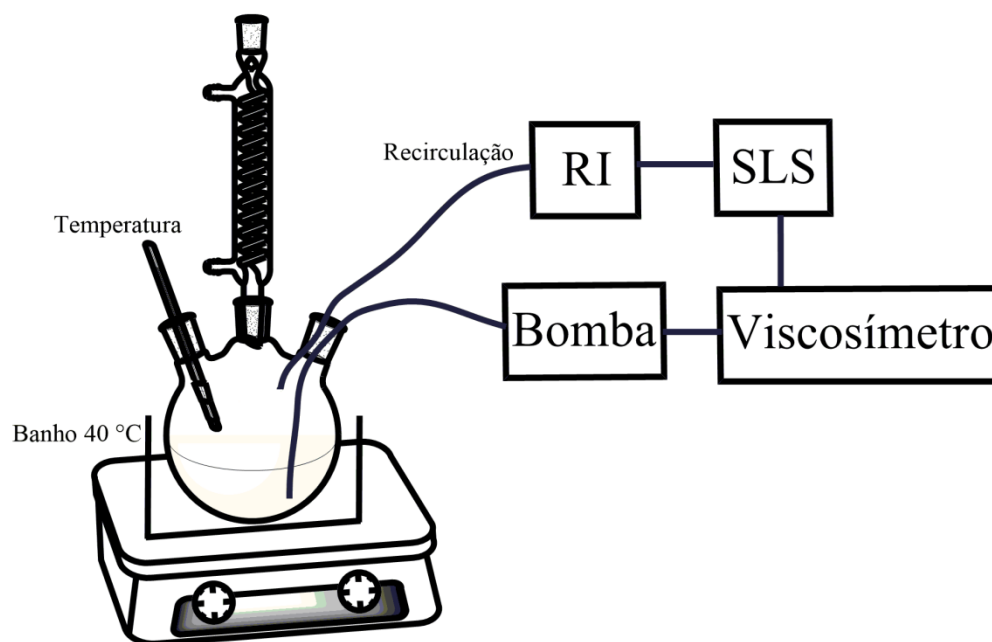
coeficiente virial ( $A_2$ ), a raiz quadrada da média do raio de giro ( $R_g = \langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ ), comprimento de persistência ( $L_p$ ), viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ). Todas as informações foram obtidas em tempo real e calculadas a partir das equações descritas no item 4.

### 3.4.1. MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os experimentos em tempo real da hidrólise enzimática foram realizados em um sistema com espalhamento de luz estático-viscosidade dependente do tempo (TDSLS-vis – *Time Dependent Static Light Scattering-Viscometer*), conforme esquema mostrado na **Figura 6**, onde foram determinados os parâmetros macromoleculares da hidrólise enzimática das diferentes fontes de XG com enzima EGII.

O sistema foi constituído de um reator com controle de temperatura (40 °C), e a partir do reator foi realizada uma extração contínua a 0,5 mL.min<sup>-1</sup> utilizando uma bomba de HPLC Waters®, modelo 505 HPLC *Pump*, conectada em série a três detectores: um viscosímetro capilar de 20 cm de comprimento com 0,02” de diâmetro com um transdutor de pressão (Validyne DP15) acoplado ao voltímetro *Elenco Precision* XP-581, um módulo de espalhamento luz estático multi-ângulo (MALLS), com  $\lambda$  632,8 nm (DSP-F, *Wyatt Technology*), um detector diferencial de índice de refração (IR – Waters 2410). Os dados foram obtidos utilizando o *software* ASTRA Wyatt, versão 4.70.07 e analisados no Kaleidagraph versão 4.1 (Reading, PA, USA).

Alíquotas de 1 mL foram coletadas do reator durante as reações em 10 e 140min, e a enzima EGII foi inativada a 100 °C por 10 min. As amostras foram submetidas, sem nenhum tratamento prévio, às análises por HPAEC e SEC, conforme descrito no item 3.5.1 e 3.5.2 respectivamente, para avaliação dos efeitos da hidrólise enzimática no polissacarídeo.



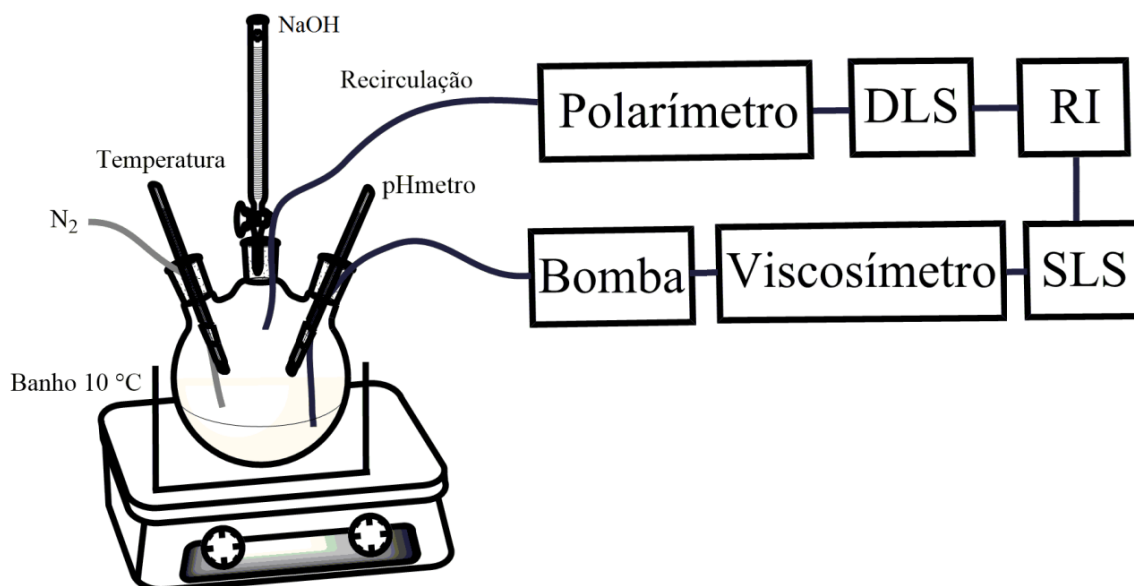
**FIGURA 6:** ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS TDSLS-vis PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS XGT E XGJ COM EGII.

### 3.4.2. MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA OXIDAÇÃO COM CATALISADOR TEMPO

Um sistema de monitoramento ACOMP foi utilizado para acompanhar em tempo real a oxidação do polissacarídeo, um esquema do sistema é mostrado na **Figura 7**.

Os parâmetros reacionais como temperatura e pH (Jenway 3540 pHmeter) foram controlados. As reações foram monitoradas por meio da extração contínua a partir do reator, com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , utilizando-se uma bomba Shimadzu LC-10AD. A solução polimérica passou sequencialmente, por um conjunto de detectores em série composto por: sistema customizado de viscosímetro capilar de 20 cm de comprimento com 0,02" de diâmetro (Validyne), espalhamento de luz estático multi-ângulo com  $\lambda$  660 nm (Brookhaven Instrumenst MwA), detector de índice de refração (RI 10A – Shimadzu), um NanoDLS (*Brookhaven Instruments*) ângulo de referência  $90^\circ$  em modo de fluxo com  $\lambda$  660 nm e um polarímetro AUTOPOL V (Rudolph Research Analytical) com  $\lambda$  436 nm e célula de 100 mm.

Foram monitoradas continuamente as mudanças de viscosidade, espalhamento de luz estático e dinâmico, dados de polarimetria do polímero formado, permitindo avaliar as mudanças macromoleculares ( $M_w$ ,  $R_g$ , rotação ótica), hidrodinâmicas ( $\eta_r$  e  $R_h$ ), bem como o grau de oxidação calculado através do volume adicionado de NaOH para manter o pH do meio reacional. Essas informações permitiram comparar as diferenças entre as reações nas diferentes condições estudadas e quantificar sua eficiência. Todos os dados foram obtidos utilizando o software *Brookhaven Instruments Time Dependant Static Light Scattering* TDSLSW32 versão 1.15 e analisados no Kaleidagraph versão 4.1 (Reading, PA, USA).



**FIGURA 7:** ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS ACOMP PARA AS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA XGT COM CATALISADOR *TEMPO*.

A reação de oxidação foi interrompida adicionando uma solução alcoólica com NaBH<sub>4</sub> e o pH ajustado para 7.0. O produto final foi purificado em membrana de diálise durante 48 h contra água purificada, para retirar excesso de reagentes e sais formados durante a reação, rota-evaporados, precipitados com etanol e secos a temperatura ambiente. O material oxidado obtido foi solubilizado com concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e, posteriormente, caracterizadas por SEC conforme item 3.5.2 e ACM item 3.5.3.

### 3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS

#### 3.5.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA

A quantificação dos oligossacarídeos de XGT e XGJ produzidos na hidrólise foi analisada por cromatografia de troca aniônica (HPAEC) em um sistema ICS-5000 Thermo Scientific, usando coluna Carbowpack PA-100, ED eletrodo de ouro e um detector de pulso amperométrico (PAD). As amostras foram preparadas em água purificada com concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e filtradas em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ . A fase móvel utilizada foi uma solução  $88 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaOH com gradiente de 3,5 a 7,5% de solução  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaOAc, fluxo de  $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ . Todos os eluentes foram mantidos sob atmosfera de nitrogênio.

Os dados foram analisados quanto a identificação dos oligossacarídeos e sua quantificação utilizando o software *Chromeleon 7*. Os oligossacarídeos, são hidratos de carbono que resultam da ligação glicosídica de entre dois a dez monossacarídeos, estes foram identificados conforme Buckeridge *et al.* (1997).

#### 3.5.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Foram submetidas a análises de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) tanto os produtos obtidos da hidrólise da XGT e XGJ quanto da oxidação da XGT, utilizando a metodologia conforme descrito a seguir.

A fase móvel utilizada nas análises de SEC foi uma solução aquosa  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  com 0,02% (m/v)  $\text{NaN}_3$ . As amostras dos produtos finais das reações foram solubilizadas na própria fase móvel, com concentração de polissacarídeos de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e filtradas sequencialmente em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de  $0,45$  e  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ .

Foram utilizados dois sistemas com diferentes configurações de detectores para as análises de SEC, que são detalhados abaixo, porém em ambos os sistemas foram utilizadas colunas de polimetacrilato da Shodex OHpak SB-806 HQ (limite de exclusão da coluna de 20.000.000). O espalhamento de luz (SLS) e detector de índice de refração (RI) foram calibrados utilizando padrões de óxido de polietileno (PEO - 22.000 g.mol<sup>-1</sup>). A calibração foi confirmada utilizando-se um padrão de Dextrana (70.000 g.mol<sup>-1</sup>) monodisperso.

O sistema utilizado para análise dos produtos obtidos na hidrólise enzimática consistiu em um equipamento Viscotek Dual Detector, acopladas ao refratômetro diferencial da Viscotek modelo VE3580, um detector de espalhamento de luz, modelo 270 Dual Detector (Viscotek), em fluxo contínuo com baixo ângulo a 7° (LALS – *Low Angle Light Scattering*) e ângulo de 90° (RALS – *Right Angle Light Scattering*) com  $\lambda$  632,8 nm, fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. As variações do índice de refração em função da concentração polimérica ( $dn/dc$ ) foram determinadas usando um refratômetro da Viscotek, modelo VE3580. Todos os dados foram obtidos utilizando o *software OmniSEC 4.7*.

O sistema utilizado para os produtos das reações de oxidação foi um sistema acoplado a um detector de espalhamento de luz multi-ângulo com  $\lambda$  660 nm (*Brookhaven Instruments MwA*), viscosímetro capilar de 20 cm de comprimento com 0,02” de diâmetro (Validyne) e detector de índice de refração (RID 10A – Shimadzu). O sistema foi conectado a um sistema de bomba Shimadzu modelo LC-10AD, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Todos os dados foram obtidos utilizando o *software Brookhaven Instruments ParSEC Chromatography 5.58*.

### 3.5.3. MISTURA CONTÍNUA AUTOMÁTICA

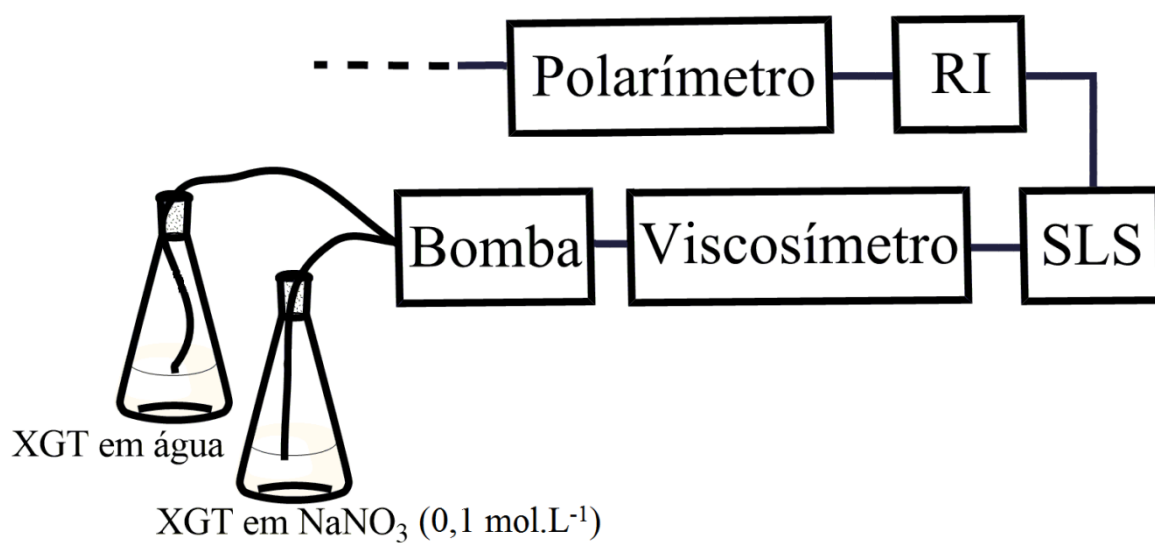
Os produtos obtidos nas diferentes condições de pH das reações de oxidação da XGT foram realizados para verificar o efeito do polieletrólito formado utilizando a técnica de análises de mistura contínua automática (ACM) conforme descrito a seguir.

Após purificação dos produtos oxidados conforme descrito em **3.4.2**, foram preparadas soluções com concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Uma fração da amostra foi solubilizada em água e a outra fração foi preparada com solução aquosa de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ .

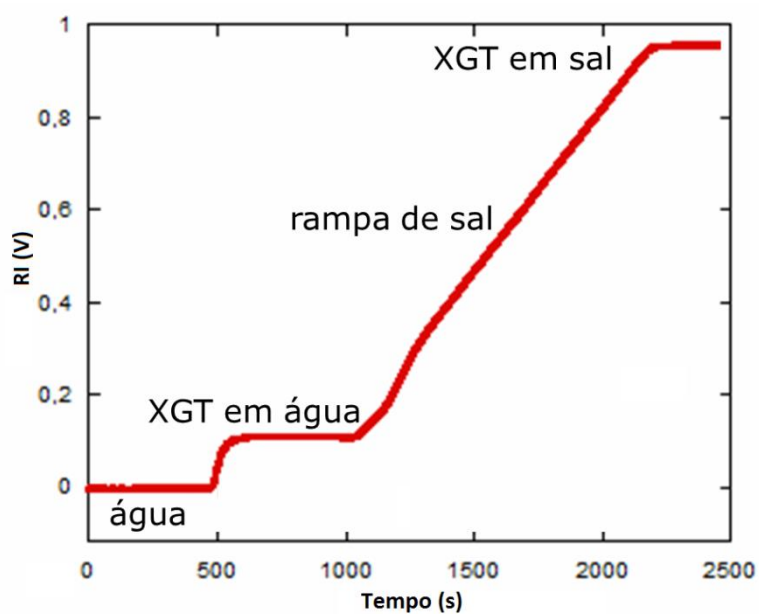
Um esquema do sistema utilizado no experimento de ACM é mostrado na **Figura 8**, que consiste num gradiente da amostra polimérica em água e a amostra polimérica em solução salina ( $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), com aumento da concentração salina de 0 a 100%. Tal estratégia permitiu que a concentração polimérica fosse mantida constante, avaliando-se apenas o efeito da concentração salina sobre o polímero, conforme mostrado na **Figura 9**.

O gradiente foi realizado de forma automática utilizando um sistema de bomba Shimadzu modelo LC-10AD e câmara de mistura quaternária Shimadzu modelo FCV-10AL com fluxo de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , acoplados em série os detectores de espalhamento de luz estático multi-ângulo com  $\lambda$  660 nm (Brookhaven Instrumenst MwA), sistema customizado de viscosímetro capilar de 20 cm de comprimento com 0,02" de diâmetro (Validyne), detector de índice de refração (RID 10A – Shimadzu) e um polarímetro AUTOPOL V (Rudolph Research Analytical) com  $\lambda$  436 nm e célula de 100 mm. A partir destas análises foram obtidos os dados de  $R_g^{**}$  e  $M_w$  em função do aumento da concentração de sal, calculados a partir das equações descritas no item **4**.

Todos os dados foram obtidos utilizando o *software Brookhaven Instruments Time Dependant Static Light Scattering TDSLW32* versão 1.15 e analisados no Kaleidagraph versão 4.1 (Reading, PA, USA).



**FIGURA 8:** ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE ACM DOS PRODUTOS FINAIS OXIDADOS DE XGT.



**FIGURA 9:** SINAL DO DETECTOR DE RI OBTIDO NOS EXPERIMENTOS DE ACM PARA VERIFICAR O EFEITO DO POLIELETROLITO SOBRE OS PRODUTOS OXIDADOS DE XGT.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA XILOGLUCANA

As amostras de XG foram caracterizadas por SEC com os detectores acoplados em série: Vis, SLS, RI, onde foi determinada a massa molar média em massa ( $M_w$ ), raio de giro ( $R_g$ ) e viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ).

As amostras XGT e XGJ mostraram um perfil de eluição homogêneo e unimodal (**FIGURA 10**) e valores de dispersão ( $\mathfrak{D} = M_w/M_n$ ) de 1,8 para XGT e 1,4 para XGJ (**TABELA 1**).

Os valores encontrados para  $M_w$  das amostras de XGT e XGJ nativas foram de  $3,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  e  $7,1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , com valores de  $R_g^*$  de 50 nm e 56 nm, respectivamente. A recuperação das amostras do sistema cromatográfico, calculado a partir do detector de RI foi de 85% para XGT e 82% para XGJ.

**TABELA 1.** RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT E XGJ NATIVAS.

AMOSTRA	$M_w$ ( $10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ )	$R_g^{**}$ (nm)	$\mathfrak{D}$	Rec (%)
XGT	3,8	50	1,8	85
XGJ	7,1	56	1,4	82

$M_w$  - massa molar média em massa,  $R_g^{**}$  - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**),  $\mathfrak{D} = M_w/M_n$  - dispersão, **REC** – recuperação cromatográfica.

Para determinar a concentração crítica ( $c^*$ ), que é a concentração de transição do regime diluído para o semi-diluído, foi utilizada a equação para uma cadeia flexível, conforme **Equação 1**.

$$c^* = \left[ \frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi N_a R_g^3} \right] \quad (1)$$

sendo:  $M_w$ , massa molar média em massa e  $R_g$ , raio de giro obtidos por SEC,  $N_a$  é o número de Avogadro.

O valor da  $c^*$  da xiloglucana ficou entre 1,2 – 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>, assim os experimentos foram realizados com soluções diluídas de polissacarídeos, sendo de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> para as reações de hidrólises e 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> para as reações de oxidação.

#### 4.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE

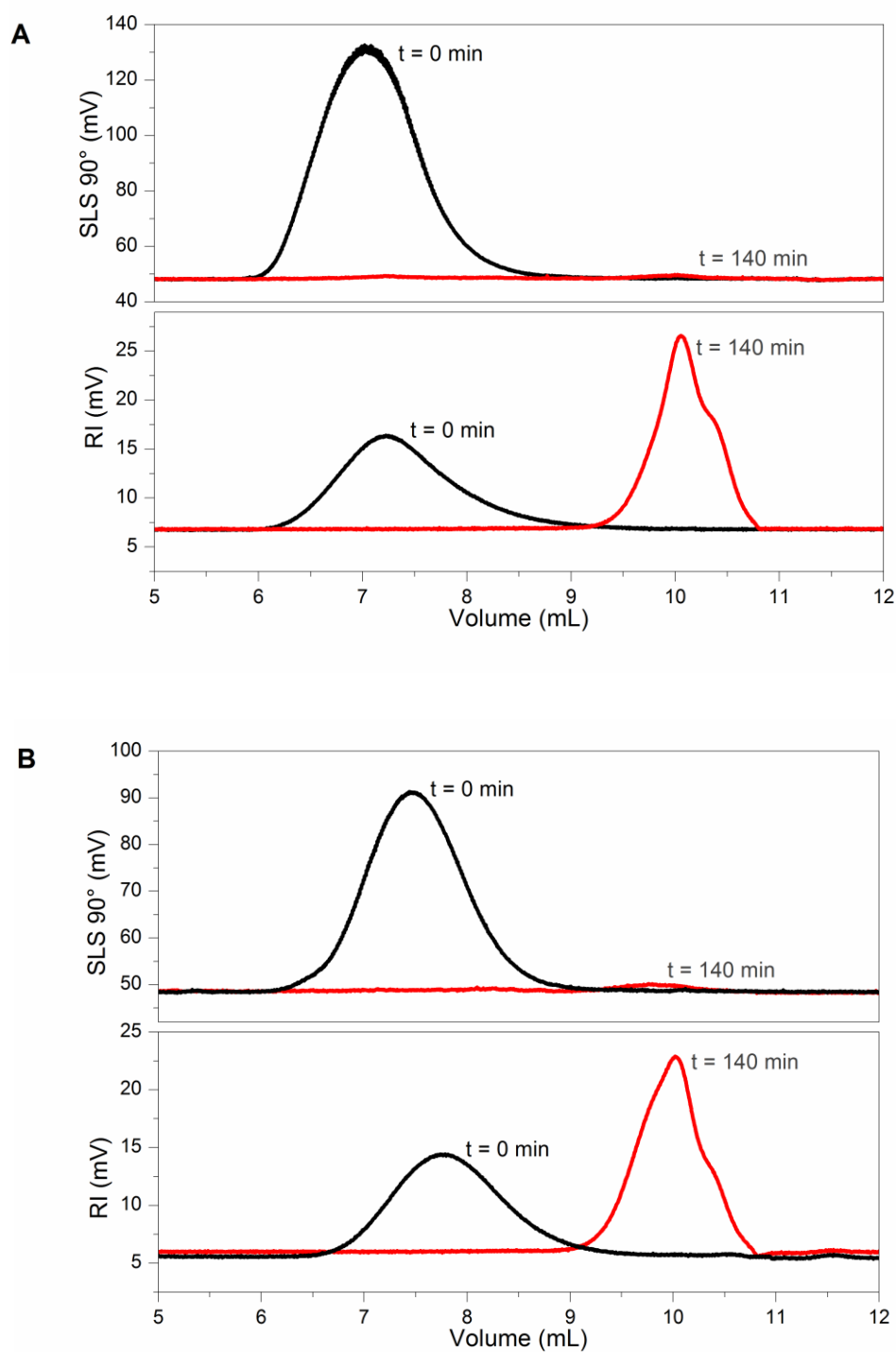
Para as reações de hidrólise das XGs com EGII ocorreu uma cinética de primeira ordem, e estas mostraram uma dependência da concentração da enzima em termos da constante de velocidade reacional ( $k$ ) (**TABELA 2**). Como esperado, em baixas concentração de enzima (0,006 e 0,009 U.mL<sup>-1</sup>) a constante de velocidade com que a reação se processa foi menor, quando comparada com a concentração de EGII de 0,012 U.mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, os valores de  $k$  obtidos para XGJ foram maiores que para XGT, sugerindo que diferenças estruturais, estrutura fina dos polissacarídeos, como a sequência ou tipo de oligossacarídeo presente, ou mesmo às diferenças de massa molar entre os polímeros, podem contribuir para as diferentes constantes de velocidade observadas para uma mesma concentração enzimática, apesar das diferentes fontes de xiloglucana.

**TABELA 2.** RESULTADOS OBTIDOS POR TDSLS-vis DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA XGT E XGJ COM EGII.

[EGII] U.mL <sup>-1</sup>	XGT		XGJ	
	k (s <sup>-1</sup> )/ 10 <sup>-3</sup>	R	k (s <sup>-1</sup> )/ 10 <sup>-3</sup>	R
<b>0,006</b>	48,5±2,5	0,985	68,8±4,7	0,920
<b>0,009</b>	51,2±2,3	0,989	97,6±7,5	0,929
<b>0,012</b>	72,7±1,4	0,993	146,0±10,0	0,917

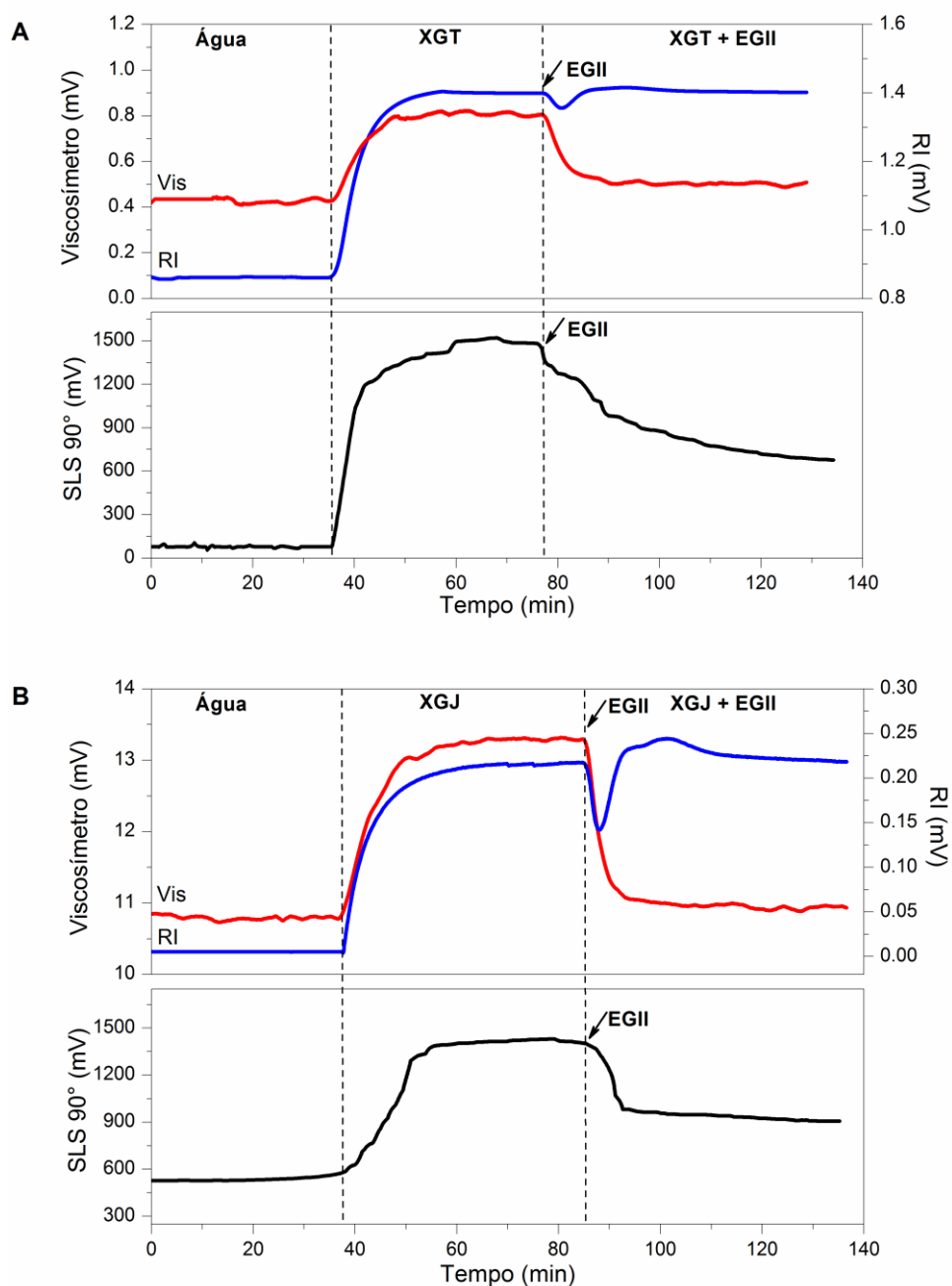
**k** – constante de velocidade assumido cinética de primeira ordem **R** – desvio padrão

Utilizando o detector de índice de refração (RI) do TDSLS-vis, que é diretamente proporcional à concentração da solução, observou-se que, durante a reação, o sinal do RI manteve-se constante, o que confirma que a concentração no reator não foi alterada durante a reação enzimática. O sinal do viscosímetro diminuiu após adição da enzima, praticamente retornando aos valores de linha de base do solvente, o que sugere que a cadeia sofreu degradação em pequenos oligômeros, como observado nas análises por SEC (**FIGURA 10**).



**FIGURA 10.** PERFIL DE ELUIÇÃO DE SEC DAS AMOSTRAS DE XGT **(A)** E XGJ **(B)** NATIVA ( $t = 0$  min) E PRODUTO FINAL HIDROLISADO ( $t = 140$  min) COM EGII  $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$  UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A  $90^\circ$  (SLS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).

O sinal bruto dos detectores da reação em tempo real das amostras de XGT e XGJ com concentração de EGII de  $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$  são apresentados na **Figura 11**.



**FIGURA 11.** HIDRÓLISE EM TEMPO REAL DA XGT **(A)** E XGJ **(B)** COM EGII  $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$  USANDO DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A  $90^\circ$  (SLS), DETECTOR VISCOSIMÉTRICO (vis) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI). AS SETAS INDICAM O MOMENTO DA ADIÇÃO DA ENZIMA EGII.

Os dados viscosimétricos foram utilizados para determinar parâmetros macromoleculares em solução, uma vez que agregados moleculares interferiram no sinal do SLS nos dados em tempo real (**Figura 11A e 11B**). O uso do viscosímetro permitiu o cálculo da viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) em tempo real, conforme a **Equação 2**.

$$\eta_{red} = \left( \frac{V_{amostra} - V_{solvente}}{V_{solvente} - V_{fluxo\ zero}} \right) / C_{amostra} \quad (2)$$

sendo:  $V_{amostra}$ ,  $V_{solvente}$  e  $V_{fluxo\ zero}$  os sinais em voltagem do detector de viscosidade (detector diferencial de pressão) para a amostra, solvente e com fluxo zero, respectivamente.

Em soluções diluídas, assumiu-se que a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é  $\cong \eta_{red}$ . Assim, através dos dados de  $[\eta]$ , pode-se calcular o  $R_g$ , que fornece informações sobre as dimensões globais da cadeia, utilizando a equação de Flory-Fox (1953) (**EQUAÇÃO 3**).

$$[\eta] = 6^{3/2} \varphi_0 \frac{\langle S^2 \rangle_0^{3/2}}{M} \quad (3)$$

sendo:  $[\eta]$  corresponde a viscosidade intrínseca,  $\varphi_0$  é a constante de Flory-Fox ( $2,56 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ),  $\langle S^2 \rangle_0^{3/2} \cong R_g$  e  $M$  é a massa molar.

O comprimento de persistência ( $L_p$ ), que corresponde ao comprimento rígido mínimo da cadeia polimérica foi determinado pela equação de Benoit-Doty para o modelo *worm-like* de Kratky-Porod, conforme **Equação 4**.

$$R_g^2 = \frac{L \cdot L_p}{3} - L_p^2 + \frac{2 \cdot L_p^3}{L} - 2 \cdot \left( \frac{L_p^4}{L^2} \right) * \left[ 1 - \exp * \left( \frac{-L}{L_p} \right) \right] \quad (4)$$

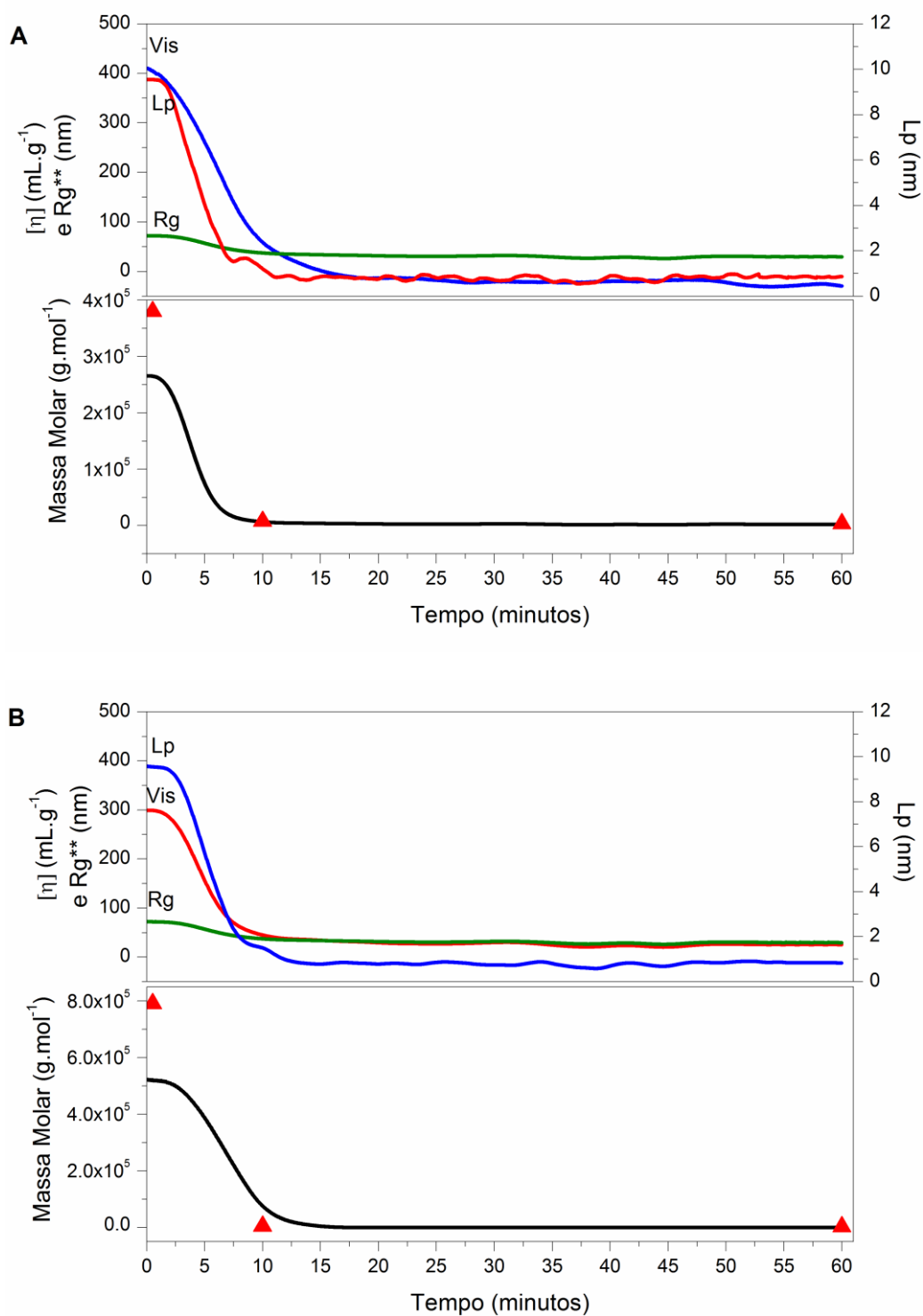
O valor de  $L_p$  foi calculado, multiplicando-se o grau de polimerização que é a razão entre a massa ponderal média e a massa molar média em massa do monômero da XG ( $360 \text{ g.mol}^{-1}$ ) por  $L$ , que corresponde ao comprimento do monômero, sendo  $0,52 \text{ nm}$  para a XG (FREITAS *et al.*, 2005).

Os perfis dos parâmetros macromoleculares como  $[\eta]$ ,  $R_g$ ,  $L_p$  e  $M_{wapp}$  obtidos durante hidrólise de XGT e XGJ são mostrados nas **Figuras 12A e 12B**.

Foram coletadas alíquotas durante a reação para análise em SEC e os resultados são mostrados na **Tabela 3** para as amostras de XGT e XGJ tratadas com EGII  $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ . As concentrações de enzimas  $0,006$  e  $0,012 \text{ U.mL}^{-1}$  apresentaram comportamento similar, os dados estão apresentados no **ANEXO 1**.

Os dados apresentados na **Tabela 3** e na **Figura 12** mostram que após  $10 \text{ min}$  de reação o valor de  $M_w$  para a XGT diminuiu para  $3365 \text{ g.mol}^{-1}$  ao final de  $140 \text{ min}$  de reação. O mesmo comportamento foi observado para XGJ, a  $M_w$  diminuiu para  $2393 \text{ g.mol}^{-1}$  em  $140 \text{ min}$ . A  $[\eta]$  diminuiu de  $360$  para  $5 \text{ mL.g}^{-1}$  e de  $410$  para  $2 \text{ mL.g}^{-1}$ , no mesmo intervalo de tempo para XGT e XGJ, respectivamente. Observa-se uma diminuição após  $10 \text{ min}$  de reação dos valores de  $R_g$  para ambas as amostras, de  $50$  para  $2 \text{ nm}$  para XGT e  $56$  para  $1 \text{ nm}$  para XGJ.

Os resultados de SEC são mostrados na **Figura 12** representados pelos triângulos vermelhos no gráfico. A partir destes dados foi possível calcular a fração de massa do polímero após  $140 \text{ min}$  de reação, sendo de apenas  $0,32\%$  e  $0,16\%$  de polímero na cadeia para XGT e XGJ, respectivamente. Sendo assim, neste momento, as amostras de XG foram reduzidas a uma mistura de oligômeros de  $1$  a  $3$  unidades de oligossacarídeos da cadeia polimérica inicial, como pode ser observado nas **Figura 10 e Figura 12** e na **Tabela 3**.



**FIGURA 12.** PARÂMETROS MACROMOLECULARES OBTIDOS EM TEMPO REAL DA HIDRÓLISE DE XGT **(A)** E XGJ **(B)** COM EGII 0,009 U.mL<sup>-1</sup>. OS TRIÂNGULOS VERMELHOS MOSTRAM OS VALORES DE MASSA MOLAR OBTIDOS POR ANÁLISES DE SEC.



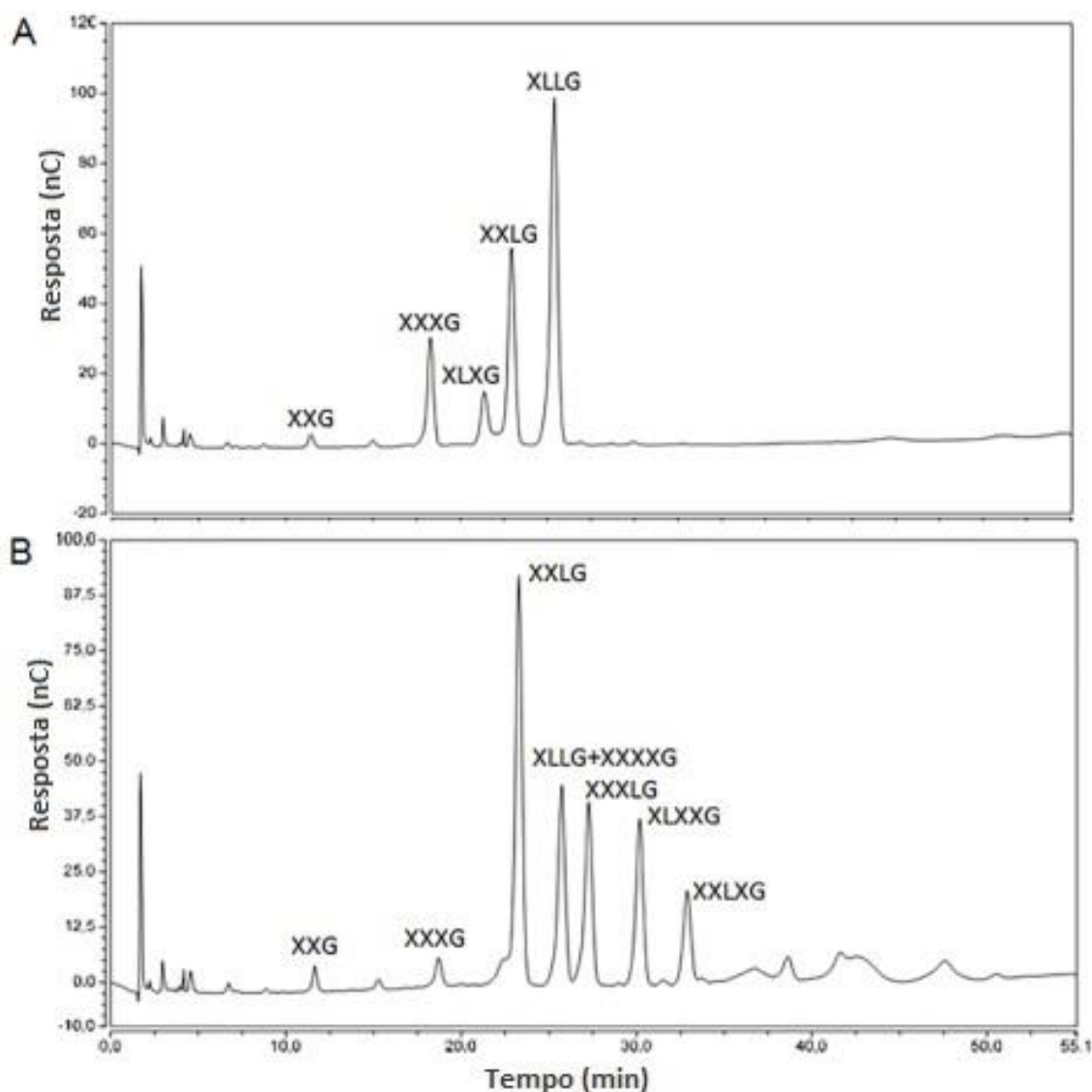
**TABELA 3.** RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT E XGJ NATIVA E ALÍQUOTAS EM 10 E 140 MIN DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM EGII A 0,009 U.mL<sup>-1</sup>.

Amostra	[EGII] U.mL <sup>-1</sup>	Tempo (min)	M <sub>w</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	Đ	[η] (mL.g <sup>-1</sup> )	R <sub>g</sub> <sup>**</sup> (nm)	Rec (%)	Massa Residual (%)
XGT	-	0	3,8x10 <sup>5</sup>	1,8	360	50	85	100,00
	0,009	10	7534	1,7	20	3	80	0,71
		140	3365	1,6	5	2	77	0,32
XGJ	-	0	7,1x10 <sup>5</sup>	1,4	410	56	82	100,00
	0,009	10	4562	1,4	11	1	80	0,31
		140	2393	1,3	2	1	84	0,16

M<sub>w</sub> - massa molar média em massa, Đ = M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> - dispersão [η] - viscosidade intrínseca, R<sub>g</sub><sup>\*\*</sup> - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**), REC – recuperação cromatográfica.

As alíquotas coletadas durante a reação foram analisadas por HPAEC, os resultados das proporções de oligossacarídeos das amostras XGT e XGJ da hidrólise com concentração de EGII 0,009 U.mL<sup>-1</sup> são mostrados na **Tabela 4**. Para as concentrações de enzimas 0,006 e 0,012 U.mL<sup>-1</sup> apresentaram comportamento similar (Mostrados no **ANEXO 2** e **ANEXO 3**).

Uma hidrólise total foi realizada a fim de comparar os monossacarídeos formados com as alíquotas retiradas durante a reação em tempo real. Para esta reação de 1440 min, foi utilizado concentração de enzima de 0,012 U.mL<sup>-1</sup>. Para as amostras de XGT (**Figura 13A**) e XGJ (**Figura 13B**) é possível observar que houve formação de monossacarídeos nas mesmas proporções, independente da concentração de enzima.



**FIGURA 13.** PERFIL DE ELUIÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XGT **(A)** E XGJ **(B)** HIDROLISADOS COM EGII  $0,012 \text{ U.mL}^{-1}$  DURANTE 24 h OBTIDOS POR HPAEC.

Como apresentados na **Tabela 4** e na **Figura 13** são observadas diferentes composições de oligossacarídeos para as amostras de XG estudadas. Amostras de XGT são constituídas pela seguinte série de oligossacarídeos: XXG, XXXG, XLXG, XXLG e XLLG. Entretanto, a XGJ além da série citada, apresenta uma nova série de oligossacarídeos, composta por: XXXXG, XXXLG, XLXXG e XXLXG. Os oligossacarídeos foram identificados, conforme trabalho previamente realizado por Freitas *et al.* (2005), De Alcântara, Dietrich, Buckeridge (1999) e Buckeridge *et al.* (1997) que, utilizando a mesma coluna cromatográfica (coluna Carbowack PA-100), separaram e identificaram os oligossacarídeos constituintes de XGT e XGJ.

**TABELA 4.** RESULTADOS OBTIDOS POR HPAEC DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE XGT E XGJ HIDROLISADOS (m/m%) COM EGII 0,009 U.mL<sup>-1</sup>.

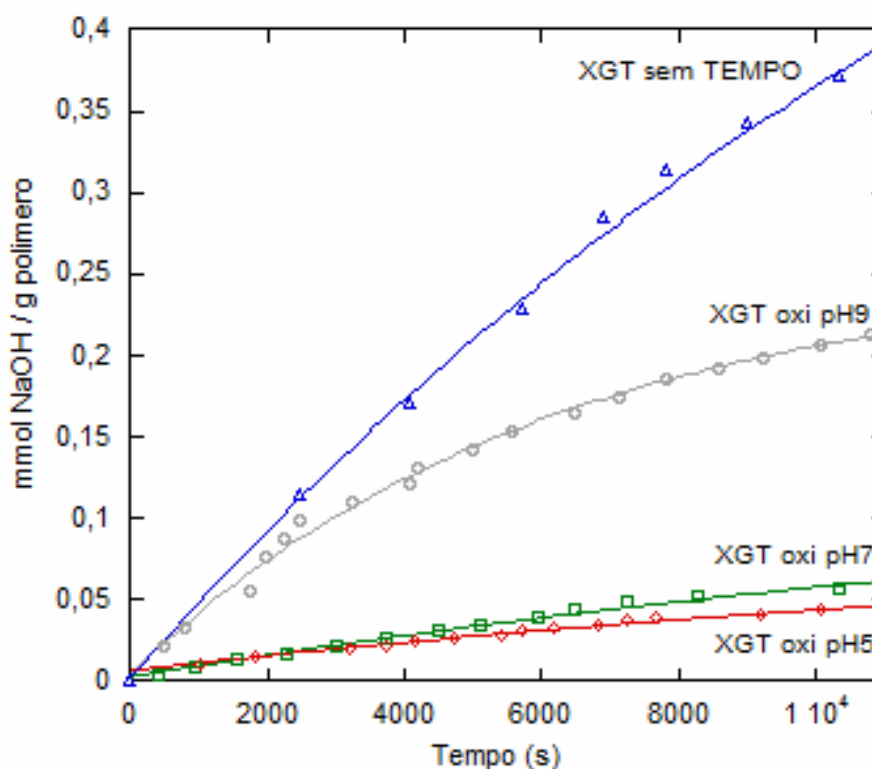
Tempo (min)	XXG	XXXG	XLXG	XXLG	XLLG+ XXXXG*	XXXLG	XLXXG	XXLXG
<b>XGT</b>								
<b>10</b>	4,9	45,1	5,5	35,6	8,9	-	-	-
<b>30</b>	3,2	42,2	5,1	38,2	11,2	-	-	-
<b>60</b>	3,1	41,5	5,7	38,2	11,6	-	-	-
<b>90</b>	3,3	42,2	5,1	38,2	11,2	-	-	-
<b>120</b>	3,2	41,9	5,6	37,6	11,8	-	-	-
<b>140</b>	3,1	40,2	5,8	38,9	11,9	-	-	-
<b>1440</b>	1,7	14,4	8,9	23,1	51,8	-	-	-
<b>XGJ</b>								
<b>10</b>	0,3	3,8	-	31,8	1,9	42,8	17,4	1,9
<b>30</b>	3,0	3,0	-	27,5	5,7	41,5	17,1	2,2
<b>60</b>	2,7	2,7	-	25,5	1,4	49,8	16,1	1,9
<b>90</b>	3,0	3,3	-	30,6	2,4	37,4	18,8	4,4
<b>120</b>	3,1	3,3	-	30,7	2,2	37,4	18,7	4,6
<b>140</b>	3,3	3,5	-	31,5	2,4	39,7	17,4	2,1
<b>1440</b>	1,5	3,0	-	35,0	18,5	17,7	15,2	9,2

\*para XGJ a mistura de oligossacarídeos XLLG + XXXXG contém somente XLLG

### 4.3. OXIDAÇÃO COM CATALISADOR *TEMPO*

A modificação química de polissacarídeos neutros via oxidação com catalisador *TEMPO* gera cargas negativas ao longo da cadeia polimérica, dando-lhe um caráter de poliânion. A oxidação dos álcoois a ácido carboxílico, faz com que o pH do meio reacional diminua ao longo do tempo de reação de oxidação. Assim, para manter o pH do meio e a seletividade da reação de oxidação, o meio reacional foi titulado com uma solução aquosa  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaOH, gerando carboxilato de sódio.

O gráfico de consumo da solução básica durante o processo de oxidação da XGT com o catalisador *TEMPO* é apresentado na **Figura 14**, onde a quantidade de NaOH consumida foi correlacionada a quantidade de álcool oxidado, principalmente os álcoois primários, ou seja, a conversão do polissacarídeo em poliânion.



**FIGURA 14.** RESULTADO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (MMOL COOH/g DE POLÍMERO) OBTIDO POR TITULAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO DE XGT EM pH 9, pH 7, pH 5 E SEM O CATALISADOR *TEMPO* A pH 9.

Observa-se que foi consumido um maior número de mols de NaOH por grama de polissacarídeo durante a reação sem o catalisador *TEMPO* a pH9, comparando-se com as reações com *TEMPO* a pH 9, e um número de mols ainda menor de NaOH por grama de polissacarídeo foi consumido para as reações em pH 7 e pH 5.

Nas diferentes condições de pH houve uma dependência em termos de constante de velocidade para as reações de oxidação da XGT estudadas, como mostrado na **Tabela 5**. Considerando-se uma cinética de primeira ordem para reação de oxidação as constantes de velocidade (*k*) foram de  $1,62 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  para a reação com catalisador *TEMPO* a pH 9 e reduziram para  $0,53 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  a pH 7 e  $0,52 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  a pH 5. Observou-se que, mesmo na ausência do catalisador *TEMPO*, a constante de velocidade da reação de oxidação foi de  $0,58 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ .

Como o total de carboidrato oxidado foi maior na reação sem o *TEMPO*, e mais adiante no texto será demonstrado que o polissacarídeo teve uma redução na massa molar de forma dependente em diferentes concentrações do catalisador *TEMPO*, é possível que as espécies reativas de oxigênio formadas no meio reacional causem despolimerização da cadeia com formação de carbonos redutores (C-1) livres (aldeído) que podem sofrer oxidação gerando ácido carboxílico. Assim, não se pode descartar que a extensiva oxidação do polissacarídeo, de forma não seletiva, possa ter contribuído para processos de degradação da cadeia polimérica.

**TABELA 5.** RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.

AMOSTRA	$10^{-4} k$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Grau de Oxidação ( $\text{mmol.g}^{-1}$ )	R
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH9</b>	1,62	0,255	0,998
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH7</b>	0,53	0,136	0,997
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH5</b>	0,52	0,098	0,995
<b>XGT<sub>sem TEMPO</sub></b>	0,58	0,831	0,997

**k** – constante de velocidade assumido cinética de primeira ordem, **R** – desvio padrão

Como pode ser observado na **Tabela 5** e na **Figura 14** o grau de oxidação também é dependente do pH do meio reacional, sendo maior para a reação em pH 9 na presença do *TEMPO* ( $0,255 \text{ mmol.g}^{-1}$ ). As reações em pH 7 e pH 5 com *TEMPO* apresentaram grau de oxidação próximos, de  $0,136 \text{ mmol.g}^{-1}$  e  $0,098 \text{ mmol.g}^{-1}$ , respectivamente. A reação sem *TEMPO* apresentou grau de oxidação de  $0,831 \text{ mmol.g}^{-1}$ . Este alto valor de oxidação é um indício de que a ausência do catalisador *TEMPO* provocou uma oxidação não seletiva, ou seja, oxidação não apenas no álcool primário em C-6, mas ao longo de toda a cadeia do polissacarídeo.

Na **Tabela 6** são apresentados os dados de viscosidade intrínseca calculada conforme **Equação 2** e os valores de  $R_g^{**}$  obtidos pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**). Os resultados da amostra de XGT nativa é apresentado para fins comparativos com os resultados experimentais obtidos em tempo real das reações de oxidação nas diferentes condições de pHs (9, 7 e 5) e sem o catalisador *TEMPO* em pH 9.

**TABELA 6.** RESULTADO OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH

AMOSTRA	$dn/dc$ ( $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ )	$M_w$ ( $10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ )	$R_g^*$ (nm)	$[\eta]$ ( $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ )	$R_g^{**}$ (nm)	$R_h$ (nm)	$[\alpha]$ (°)
XGT	0,140	4,8	120	517	39	194	+121
XGT <sub>oxi pH9</sub>	0,154	4,4	91	265	33	146	+83
XGT <sub>oxi pH7</sub>	0,153	4,3	95	300	35	118	+95
XGT <sub>oxi pH5</sub>	0,153	4,3	96	370	37	127	+101
XGT <sub>sem TEMPO</sub>	0,153	1,6	46	165	10	35	+96

$dn/dc$  – incremento do índice de refração,  $M_w$  - massa molar média em massa,  $R_g^*$  - raio de giro obtido pela equação de Zimm (**EQUAÇÃO 5**),  $[\eta]$  - viscosidade intrínseca,  $R_g^{**}$  - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**),  $R_h$  - raio hidrodinâmico,  $[\alpha]$  - rotação ótica  $[\alpha] = \frac{\alpha_D}{C.l}$ , sendo C = g/mL e l = comprimento da célula

O valor de  $dn/dc$ , que é o incremento do índice de refração da amostra em função da variação da concentração, não houve mudanças significativas durante o processo oxidativo, o  $dn/dc$  do material nativo é de  $0,140 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  e para o material oxidado a pH 9 é de  $0,154 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  e de  $0,153 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  para os produtos oxidados a pH 7, pH 5 e na reação sem o catalisador *TEMPO*.

Os resultados dos experimentos em tempo real foram calculados de acordo com a equação de Zimm (1948), para obter parâmetros macromoleculares como:  $M_w$ , segundo coeficiente virial ( $A_2$ ) e a média da raiz quadrada do raio de giro ( $R_g^*$  ou  $\langle S^2 \rangle_z^{1/2}$ ), foi utilizado o detector de espalhamento de luz estático multi-ângulos, cuja equação para regime diluído, baixas concentrações e para  $q^2 \langle S^2 \rangle_z \ll 1$  é:

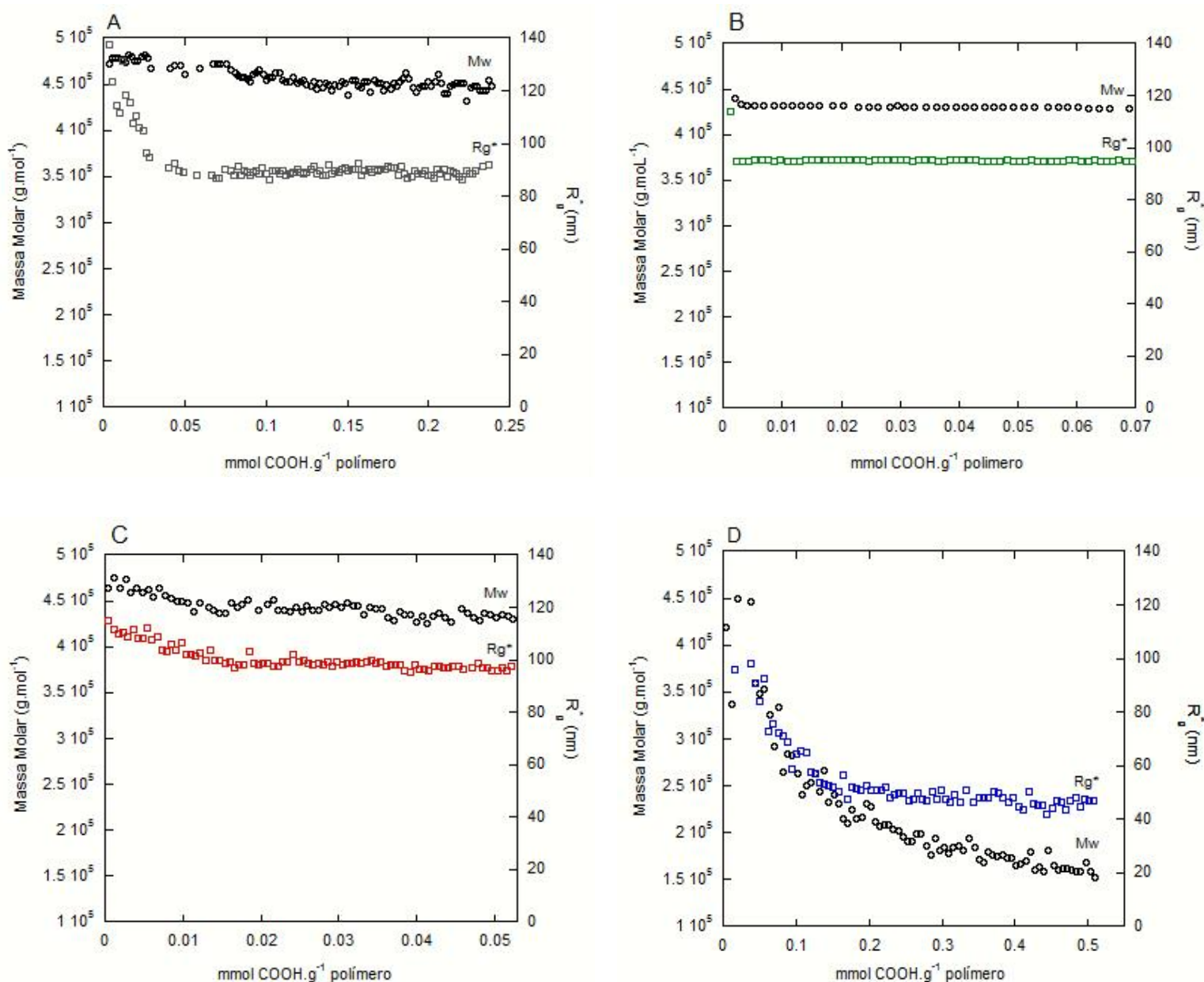
$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{q^2 \langle S^2 \rangle_z}{3} \right) + 2A_2c \quad (5)$$

em que:  $R_\theta$  é a razão de Rayleigh ( $\text{cm}^{-1}$ ) a um vetor de espalhando  $q$ , sendo  $q$  definido por  $q=(4\pi n/\lambda).\text{sen}(\theta/2)$ ,  $\theta$  é o ângulo de espalhamento,  $c$  é a concentração do polímero ( $\text{g}.\text{cm}^{-3}$ ) e  $K$  é uma constante ótica determinada de acordo com a fonte de luz incidente verticalmente polarizada de acordo com a **Equação 6**.

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{(N_A \lambda^4)} \quad (6)$$

sendo,  $n_0$  é o índice de refração do solvente,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $\lambda$  o comprimento de onda do laser (638 nm).

Na **Figura 15** são apresentados os dados de massa molar média em massa ( $M_w$ ) e o raio de giro ( $R_g^*$ ) em função do grau de oxidação da XGT obtidos pelo detector de espalhamento de luz estático e calculados pela **Equação 5**.



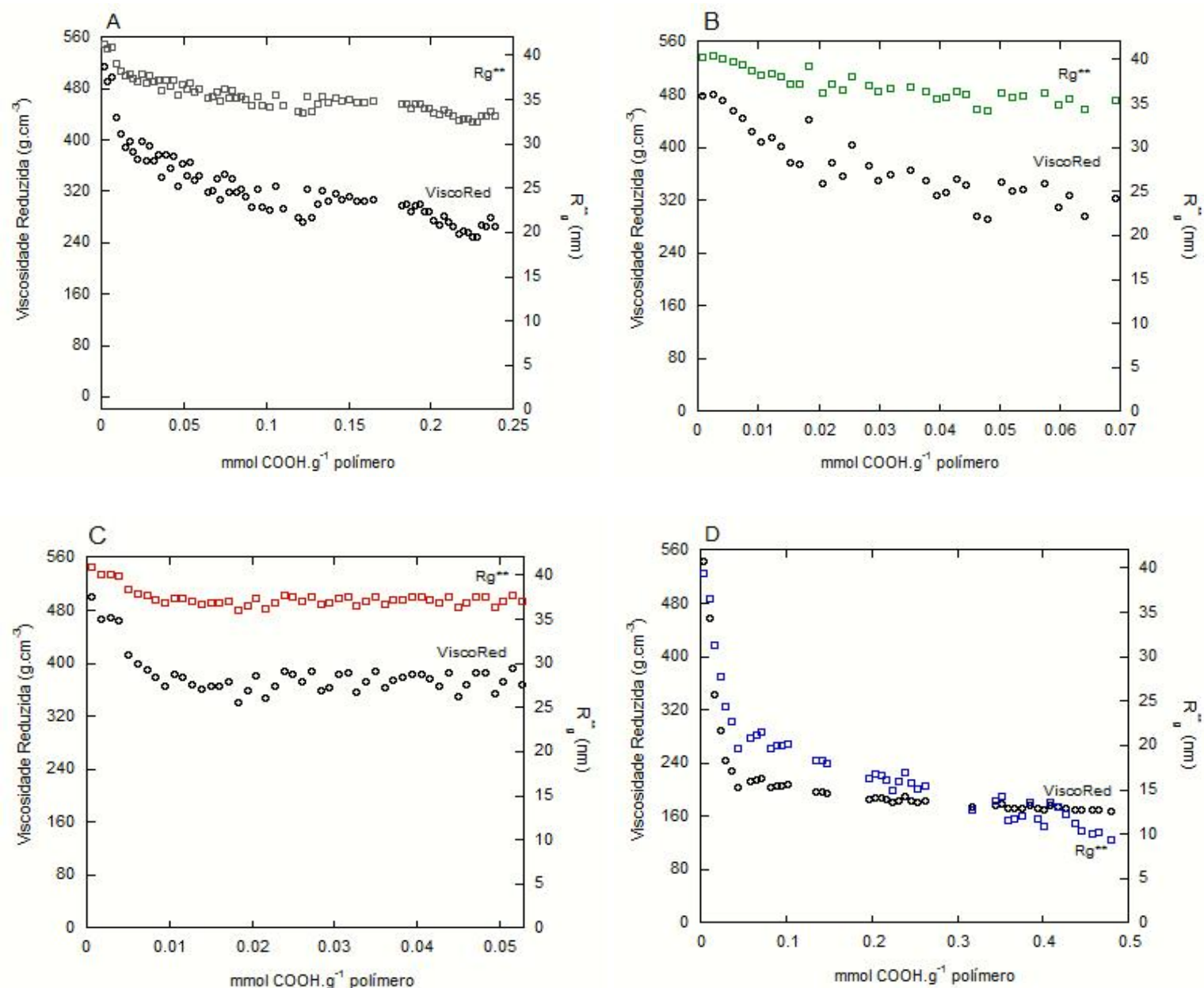
**FIGURA 15.** RESULTADOS DE MASSA MOLAR MÉDIA EM MASSA ( $M_w$ ) E RAIOS DE GIRO ( $R_g$ ) CALCULADOS PELA EQUAÇÃO DE ZIMM DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT<sub>oxi pH9</sub> (A), XGT<sub>oxi pH7</sub> (B), XGT<sub>oxi pH5</sub> (C) E XGT<sub>sem TEMPO</sub> (D) EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.



Observa-se na **Figura 15A** para a amostra  $XGT_{\text{oxi pH9}}$  que houve uma redução no valor de  $M_w$  de  $4,8 \cdot 10^5$  para  $4,4 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  e redução do  $R_g^*$  de 120 nm para 91 nm, respectivamente, do material nativo para o material oxidado.

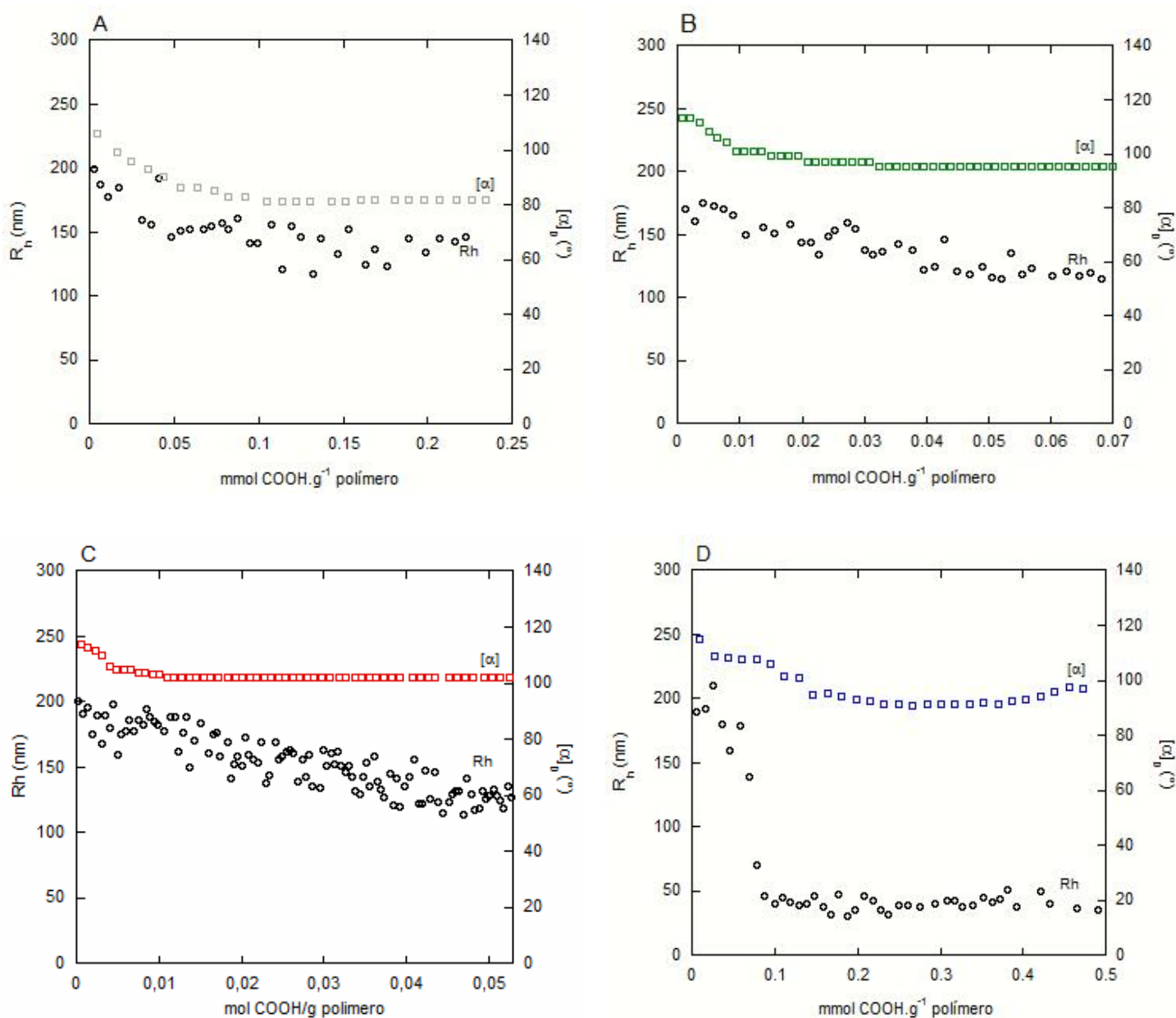
O valor de  $M_w$  reduziu para  $4,3 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  tanto na amostra  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  (**Figura 15B**) quanto na  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  (**Figura 15C**). E apresentaram valores de  $R_g^*$  de 95 nm para  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  (**Figura 15B**) e 96 nm para  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  (**Figura 15C**). A **Figura 15D** mostra os dados de  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  e observa-se uma queda nos valores de  $M_w$  para  $1,6 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  e o valor de  $R_g^*$  para 46 nm, indicando que além da oxidação, na ausência do catalisador ocorreu um processo de degradação da XGT, que será confirmado por análises de SEC dos produtos finais da reação. No item **4.3.2** será demonstrada a influência da concentração do catalisador *TEMPO* nas reações de oxidação e sua importância para prevenir a degradação polimérica observada nas diferentes condições de pH.

A **Figura 16** mostra os dados de viscosidade reduzida e raio de giro viscosimétrico ( $R_g^{**}$ ) em função do grau de oxidação da XGT. Observa-se na **Figura 16A** uma diminuição na viscosidade intrínseca de  $XGT_{\text{oxi pH9}}$  ( $265 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ), se comparada com a XGT nativa ( $517 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ), o que acarretou uma diminuição no  $R_g^{**}$  de 39 para 33 nm. O mesmo comportamento ocorreu para as amostras  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  com redução da viscosidade intrínseca para  $300 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  e  $R_g^{**}$  para 35 nm (**FIGURA 16B**),  $370 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  e 37 nm para  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  (**FIGURA 16C**). Para a reação sem o *TEMPO* mostrada na **Figura 16D** a redução na viscosidade para  $6 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$  e uma diminuição no  $R_g^{**}$  para 10 nm foram relacionadas com a degradação do polímero.



**FIGURA 16.** RESULTADOS DE VISCOSIDADE REDUZIDA (ViscoRed) E RAIO DE GIRO ( $R_g^{**}$ ) CALCULADO POR FLORY-FOX DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT<sub>oxi pH9</sub> (A), XGT<sub>oxi pH7</sub> (B), XGT<sub>oxi pH5</sub> (C) E XGT<sub>sem TEMPO</sub> (D) EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.

Esta é a primeira vez que os detectores de DLS e polarímetro são acoplados em série ao sistema ACOMP, podendo assim obter informações sobre o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), e rotação ótica ( $[\alpha]$ ) com o auxílio do polarímetro. Os dados coletados em tempo real dos derivados oxidados nas diferentes condições de pH e na ausência do catalisador *TEMPO* são mostrados na **Tabela 6** e na **Figura 17**.



**FIGURA 17.** RESULTADOS DO RAIO HIDRODINÂMICO ( $R_h$ ) E ROTAÇÃO ÓTICA ( $[\alpha]$ ) DOS PRODUTOS OXIDADOS XGT<sub>oxi</sub> pH9 (A), XGT<sub>oxi</sub> pH7 (B), XGT<sub>oxi</sub> pH5 (C) E XGT<sub>sem</sub> TEMPO (D) EM FUNÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO NOS EXPERIMENTOS DE ACOMP.

Pode-se observar que os dados de  $R_h$  diminuíram em função da modificação química realizada, em todas as condições avaliadas, mas este não apresentou alterações significativas durante as reações de oxidação. O  $R_h$  foi de 146 nm para XGT<sub>oxi pH9</sub> (**FIGURA 17A**), 118 nm para XGT<sub>oxi pH7</sub> (**FIGURA 17B**), 127 nm para XGT<sub>oxi pH5</sub> (**FIGURA 17C**) e 35 nm para XGT<sub>sem TEMPO</sub> (**FIGURA 17D**), valores menores que os observados para a XGT nativa de 194 nm, estes valores podem ser considerados muito elevados, novamente sugerindo a poluição de agregados moleculares em solução.

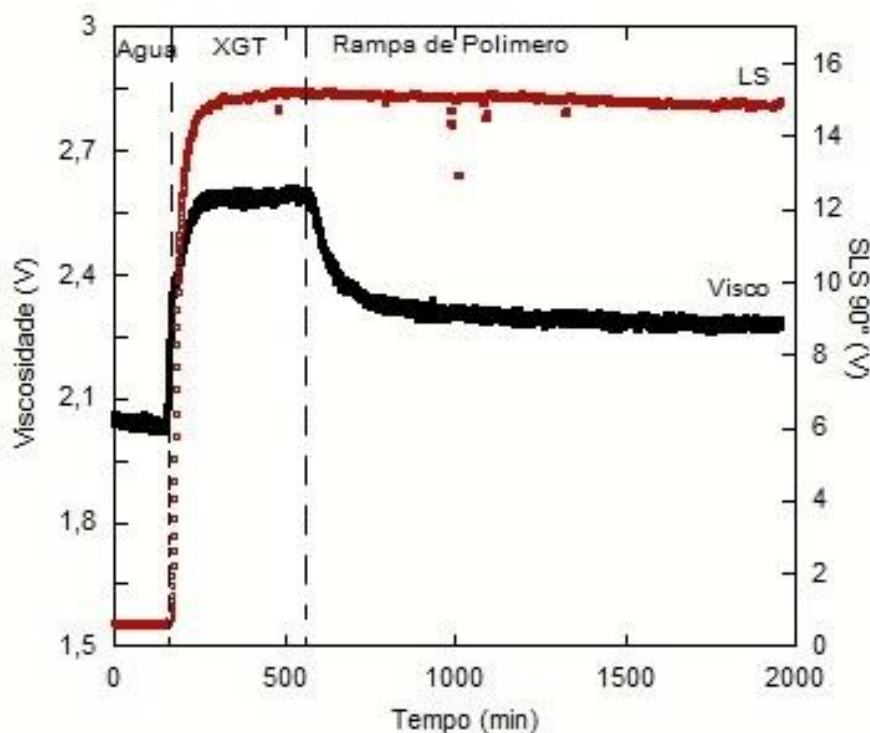
Os dados de rotação ótica observadas nos produtos oxidados sofreram uma queda quando comparados com o material nativo de +121° para +83° para XGT<sub>oxi pH9</sub> (**FIGURA 17A**), +95° para XGT<sub>oxi pH7</sub> (**FIGURA 17B**), +101° para XGT<sub>oxi pH5</sub> (**FIGURA 17C**) e XGT<sub>sem TEMPO</sub> para +96° (**FIGURA 17D**).

#### 4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS

Os produtos oxidados nas diferentes condições avaliadas foram purificados, conforme descrito no item 3.4.2 e submetidos à análise de ACM, conforme descrito no item 3.5.3, para avaliar o efeito de polieletrólito formado, e submetidos às análises de SEC, conforme item 3.5.2, para avaliar os efeitos da oxidação e degradação da cadeia polimérica. Os resultados obtidos são mostrados a seguir.

Nas análises de ACM observou-se que, em todas as amostras, nas diferentes condições de pH houve uma pequena variação na intensidade de luz espalhada, provavelmente devido à presença de agregados formados devido a auto associação da xiloglucana em solução, causando poluição do sinal do SLS. Isso explica os erros na interpretação dos resultados, como pode ser observado na **Figura 18** onde são apresentados os sinais dos detectores para a reação de oxidação a pH 9. Em contrapartida, o viscosímetro apresentou variações significativas e, portanto, foram utilizados para obtenção dos resultados

experimentais através da equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**). Os dados são apresentados na **Tabela 7**.



**FIGURA 18.** DADOS DE VISCOSIDADE (Visco) E SINAL BRUTO DO ESPALHAMENTO DE LUZ A 90° (SLS) DO PRODUTO OXIDADO XGT<sub>oxi pH9</sub> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO NOS EXPERIMENTOS DE ACM.

Foram obtidos a relação entre as contribuições eletrostáticas e os parâmetros estéricos, como  $[\eta]$ ,  $A_2$ ,  $R_g$ , dos produtos oxidados. Os valores de  $A_2$  foram calculados pela **Equação 7** (SORCI e REED, 2002).

$$A_2 = \frac{16 \pi R^3 N_A}{3M^2} \quad (7)$$

onde:  $R$  é equivalente ao raio hidrodinâmico do polímero,  $N_A$  é número de Avogadro e  $M$  é massa molar média.

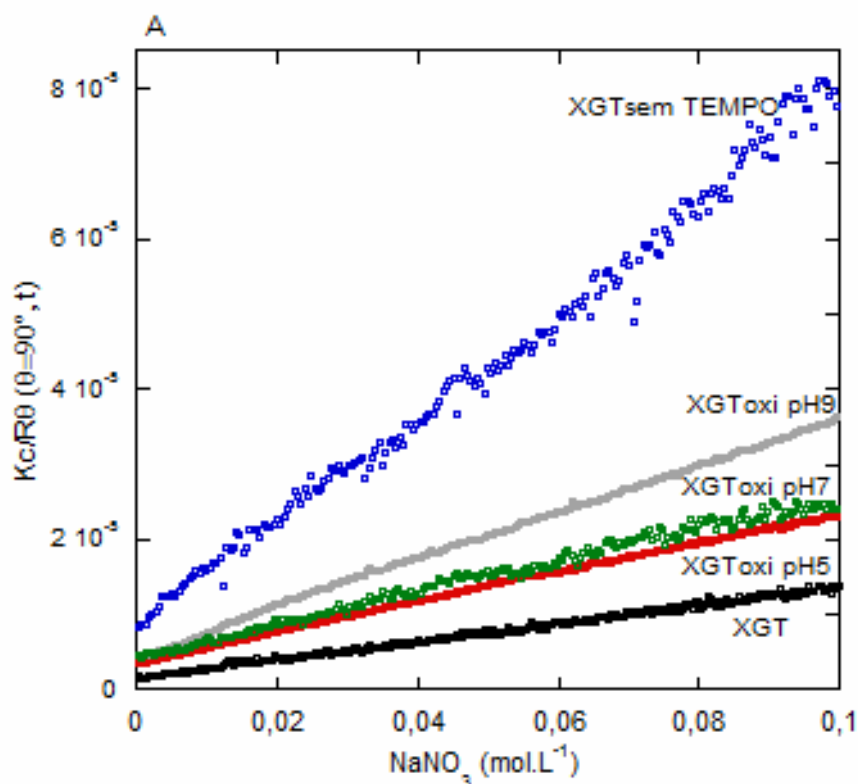
**TABELA 7.** RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DE ACM DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH

AMOSTRA	$dn/dc$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	$[\eta]$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	$R_g^{**}$ (nm)	$A_2$ ( $10^{-3} \text{cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$ )	$[\alpha]$ ( $^\circ$ )	$L_p$ (nm)
<b>XGT</b>	0,109	680	46	3,7	+108	8,8
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH 9</b>	0,140	204	24	3,0	+70	6,0
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH 7</b>	0,138	230	30	6,3	+74	11,1
<b>XGT<sub>oxi</sub> pH 5</b>	0,136	415	38	12,9	+76	17,9
<b>XGT<sub>sem</sub> TEMPO</b>	0,112	6	<10	0,08	+12	1,7

$dn/dc$  – incremento do índice de refração,  $[\eta]$  – viscosidade intrínseca,  $R_g^{**}$  - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**),  $A_2$  – segundo coeficiente virial,  $[\alpha]$  - rotação ótica  $[\alpha] = \frac{\alpha_D}{C \cdot l}$ , sendo C = g/mL e l = comprimento da célula,  $L_p$  – comprimento de persistência.

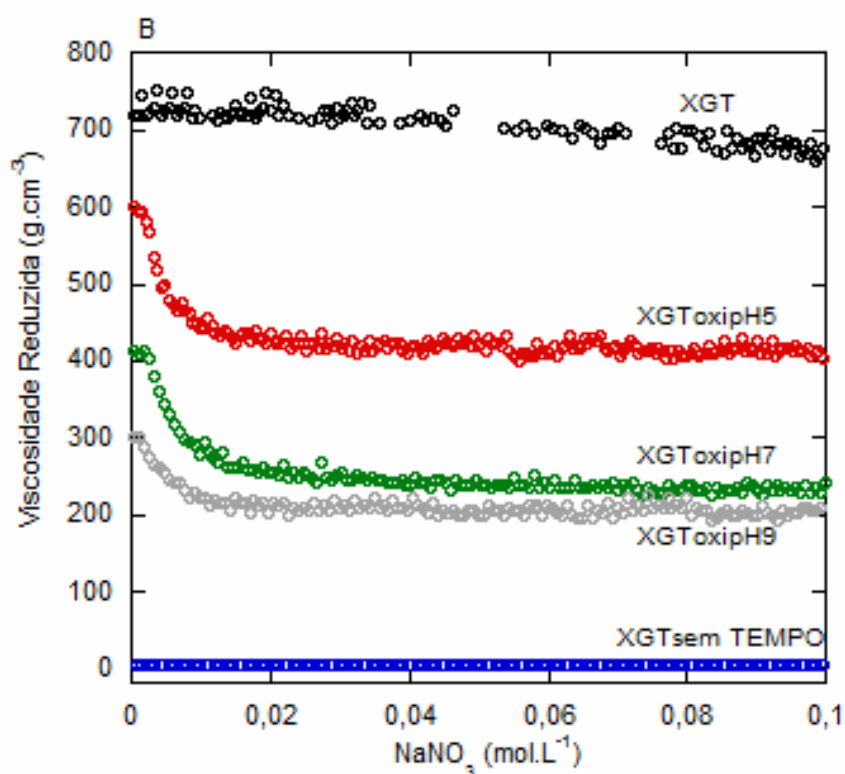
Os valores de  $dn/dc$  dos produtos oxidados (**TABELA 7**) foram relativamente menores quando em solução salina do que quando comparados com os valores em meio reacional (**TABELA 6**), sendo de  $0,109 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para a XGT nativa, de  $0,140 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para XGT<sub>oxi</sub> pH9,  $0,138 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para XGT<sub>oxi</sub> pH7,  $0,136 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para XGT<sub>oxi</sub> pH5 e  $0,112 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para XGT<sub>sem</sub> TEMPO.

Observa-se na **Figura 19** que, para as reações em pH 7 e pH 5, houve uma expansão da cadeia polimérica tendo em vista a diminuição do espalhamento de luz, quando comparada com a XGT nativa. O mesmo comportamento observa-se para as condições de pH 9 e sem o catalisador *TEMPO*. Onde houve uma diminuição da intensidade da luz espalhada em função do aumento da concentração de sal, indicando que ocorre uma contração da cadeia polimérica, ou seja, uma redução do volume excluído em função do aumento de íons em solução, confirmando assim a formação do polieletrólito durante processo oxidativo.



**FIGURA 19.** RESULTADOS DE  $Kc/R_0$  A  $90^\circ$  DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $\text{XGT}_{\text{oxi pH9}}$ ,  $\text{XGT}_{\text{oxi pH7}}$ ,  $\text{XGT}_{\text{oxi pH5}}$  E  $\text{XGT}_{\text{sem TEMPO}}$  VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.

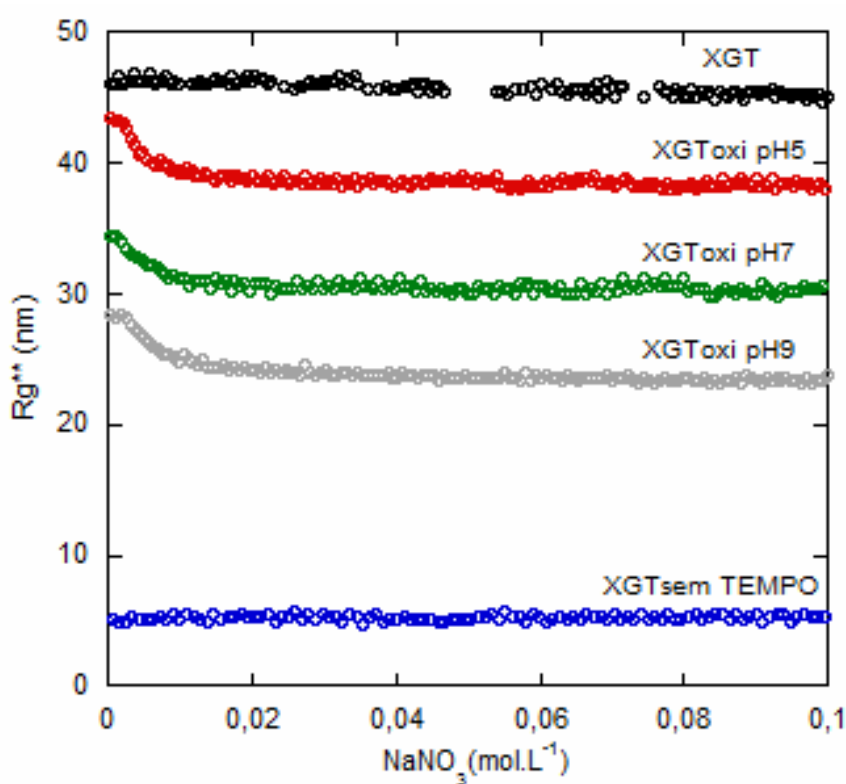
A **Figura 20** mostra os dados de viscosidade reduzida em função da adição de íons em solução. A viscosidade intrínseca da XGT nativa é de  $680 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  e para  $\text{XGT}_{\text{oxi pH9}}$  é de  $204 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  e para  $\text{XGT}_{\text{oxi pH7}}$  é de  $230 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ . Para a amostra  $\text{XGT}_{\text{oxi pH5}}$  é de  $415 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  e para  $\text{XGT}_{\text{sem TEMPO}}$  a viscosidade é de  $6 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , bastante próxima a viscosidade do solvente, sendo um indício da degradação do material.



**FIGURA 20.** RESULTADOS DE VISCOSIDADE REDUZIDA DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $\text{XGT}_{\text{oxi pH9}}$ ,  $\text{XGT}_{\text{oxi pH7}}$ ,  $\text{XGT}_{\text{oxi pH5}}$  E  $\text{XGT}_{\text{sem TEMPO}}$  VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.

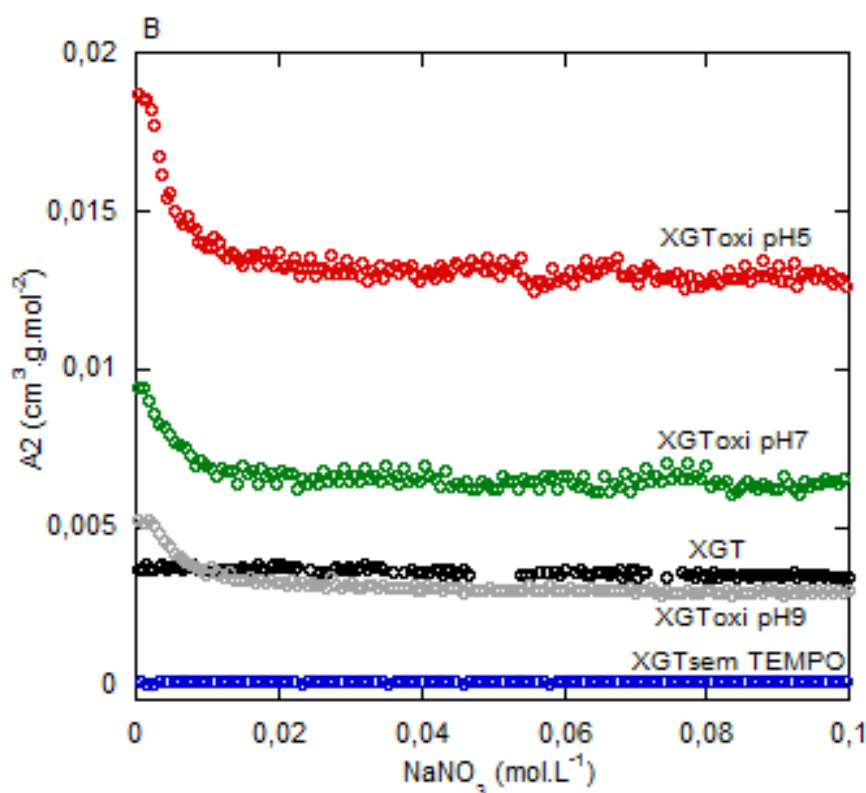


Os valores de  $R_g^{**}$  obtidos pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**) através dos dados de viscosimetria mostrados na **Figura 21** sugerem que ocorreu algum processo de desagregação da cadeia polimérica se comparados ao XGT nativo (46 nm) devido a um menor valor de  $R_g^{**}$  de 24 nm para  $XGT_{oxi\ pH9}$ , 30 nm para  $XGT_{oxi\ pH7}$  e 38 para  $XGT_{oxi\ pH5}$ , mas este não é influenciado pela presença de íons em solução. Para a amostra  $XGT_{sem\ TEMPO}$  ocorreu uma fragmentação das cadeias poliméricas, tendo em vista um menor valor de  $R_g^{**}$  (<10 nm), mas este não altera a medida que a concentração de íons em solução aumenta.



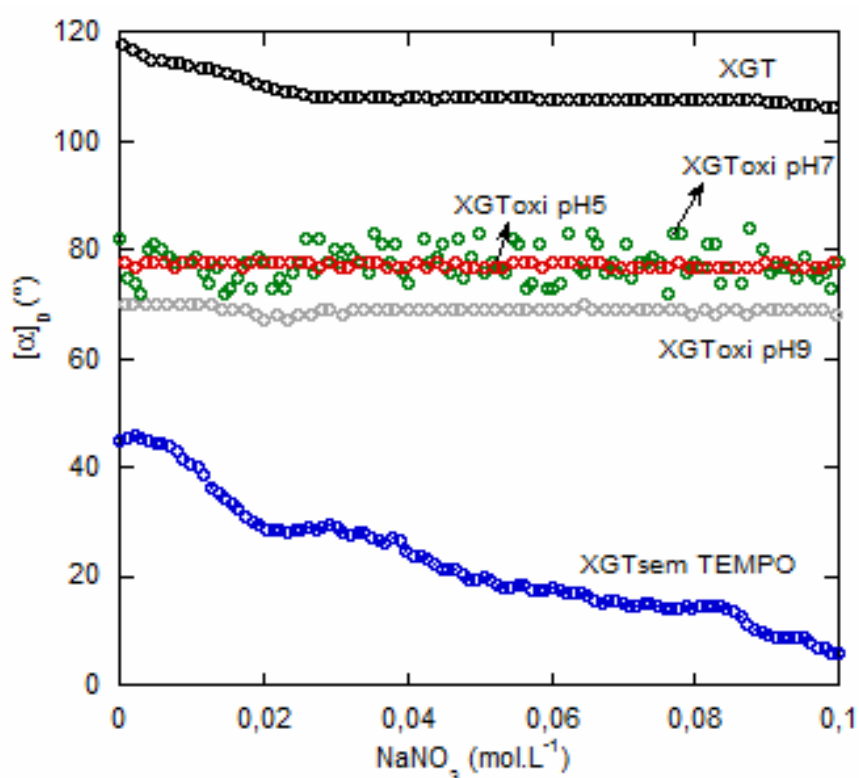
**FIGURA 21.** RESULTADOS DO RAIO DE GIRO ( $R_g^{**}$ ) CALCULADOS POR FLORY-FOX DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $XGT_{oxi\ pH9}$ ,  $XGT_{oxi\ pH7}$ ,  $XGT_{oxi\ pH5}$  E  $XGT_{sem\ TEMPO}$  VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.

A **Figura 22** mostra a afinidade do polímero pelo solvente medido pelo segundo coeficiente virial da molécula ( $A_2$ ). Observa-se que para a XGT nativa e  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  os valores de  $A_2$  permaneceram constante mesmo com o aumento da concentração de íons em solução, sendo  $A_2$  de  $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$  para a XGT e para  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  se aproxima de um solvente  $\theta$  com valor de  $A_2$  de  $0,08 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$ . Para as demais amostras o valor de  $A_2$  foi reduzido à medida que a concentração de íons em solução aumentava, chegando a  $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$  para  $XGT_{\text{oxi pH9}}$ ,  $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$  para  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  e  $12,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g} \cdot \text{mol}^{-2}$  para  $XGT_{\text{oxi pH5}}$ , indicando que ocorreu uma redução nas interações preferenciais do polímero com o solvente quando foi adicionado  $\text{NaNO}_3$  ao sistema.



**FIGURA 22.** RESULTADOS DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL ( $A_2$ ) CALCULADOS POR FLORY-FOX DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $XGT_{\text{oxi pH9}}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH7}}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  E  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL DOS EXPERIMENTOS DE ACM.

A rotação ótica apresentada na **Figura 23** é praticamente constante para as amostras nas diferentes condições de pH, sendo de  $+70^\circ$  para  $XGT_{\text{oxi pH9}}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  de  $+74^\circ$  e  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  de  $+76^\circ$  valor menor se comparado a XGT nativa de  $+108^\circ$ , indicando que ocorreu uma inversão na configuração da cadeia polimérica após a reação de oxidação e esta não é influenciada pela presença de íons em solução. Quando comparada com a XGT nativa, a  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  apresenta uma menor rotação ótica de  $+12^\circ$ .



**FIGURA 23.** RESULTADOS DE ROTAÇÃO ÓTICA DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $XGT_{\text{oxi pH9}}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH7}}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  E  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SAL NOS EXPERIMENTOS DE ACM.

Foi possível determinar o comprimento de persistência ( $L_p$ ) dos produtos formados, este parâmetro corresponde ao comprimento rígido mínimo da cadeia, podendo assim verificar a flexibilidade da cadeia polimérica. A **Tabela 7** mostra os dados de  $L_p$  em solução salina de  $\text{NaNO}_3$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  da XGT nativa de  $8,8 \text{ nm}$ , para a amostra  $XGT_{\text{oxi pH9}}$  de  $6,0 \text{ nm}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH7}}$  de  $11,1 \text{ nm}$ ,  $XGT_{\text{oxi pH5}}$  de  $17,9 \text{ nm}$  e para  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$   $1,7 \text{ nm}$ .

As informações obtidas através das análises de SEC dos produtos oxidados são mostradas na **Tabela 8**, onde foram caracterizados o material nativo e os produtos finais da oxidação nas diferentes condições estudadas, conforme descrito no item **3.5.3**. Estes foram analisados quanto à homogeneidade e a dispersão ( $\mathfrak{D}$ ) através dos detectores de índice de refração e espalhamento de luz estático a  $90^\circ$ .

Os dados apresentados de  $M_w$  e  $R_g^{**}$  na **Tabela 8** são diferentes dos apresentados na **Tabela 6**. Isso é devido a diferença de solvente utilizado, filtração e pH utilizados nas condições de análise, porém em ambos os casos se observa a mesma tendência dos resultados, apresentando com diminuição dos valores de  $M_w$  e  $R_g^{**}$  durante a oxidação do polissacarídeo.

**TABELA 8.** RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH.

AMOSTRA	$M_w$ ( $10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ )	$R_g^{**}$ (nm)	$\mathfrak{D}$	Rec (%)
XGT	5,2	39	1,8	95
XGT <sub>oxi pH 9</sub>	2,1	12	1,4	97
XGT <sub>oxi pH 7</sub>	1,9	20	2,0	93
XGT <sub>oxi pH 5</sub>	2,0	18	2,1	96
XGT <sub>sem TEMPO</sub>	1,3	9	1,7	92

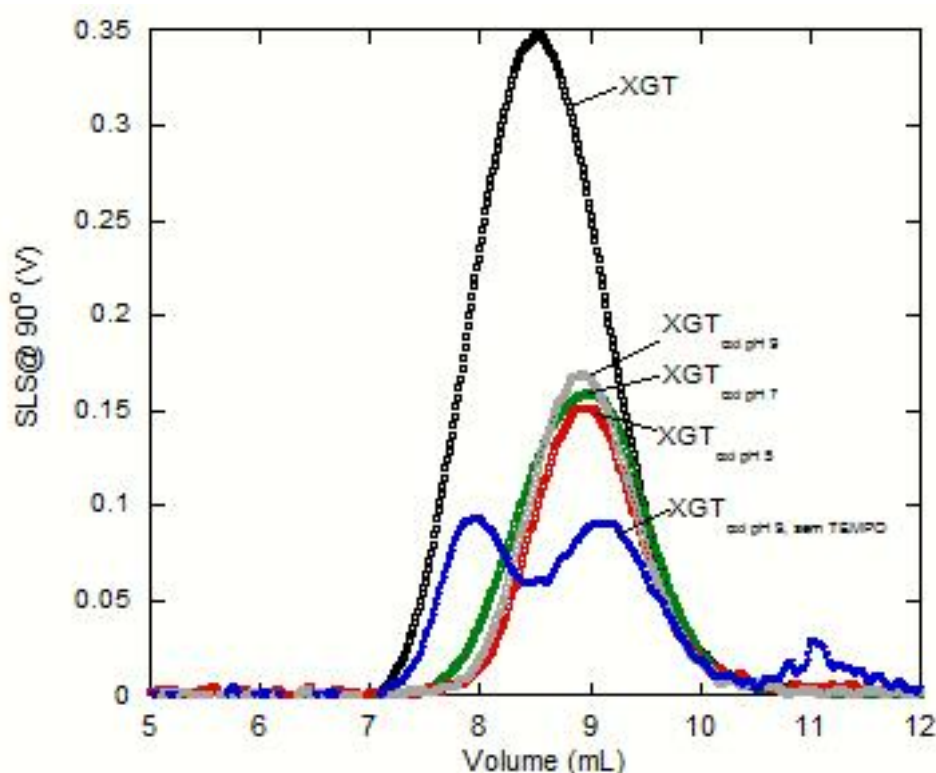
$M_w$  - massa molar média em massa,  $R_g^{**}$  - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (EQUAÇÃO 3),  $\mathfrak{D} = M_w/M_n$  - dispersão, REC – recuperação cromatográfica.

Observa-se que houve uma diminuição nos valores de  $M_w$  se comparado ao valor da XGT nativa de  $5,2 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  para  $2,1 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  na XGT<sub>oxi pH9</sub>,  $1,9 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  para XGT<sub>oxi pH7</sub>,  $2,0 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  para XGT<sub>oxi pH5</sub> e  $1,3 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  para XGT<sub>sem TEMPO</sub>. Também ocorreu uma diminuição no valor de  $R_g^*$  da XGT nativa de 39 nm, para 12 nm na XGT<sub>oxi pH9</sub>, 20 nm para XGT<sub>oxi pH7</sub>, 18 nm para XGT<sub>oxi pH5</sub> e 9 nm para XGT<sub>sem TEMPO</sub>. O valor de  $M_w$  obtido para a XGT nativa por

SEC é relativamente maior se comparado ao valor de  $M_w$  em tempo real, a mesma diferença de valores ocorre para dados de  $R_g^{**}$ , isso se deve ao fato da amostra ter sido filtrada antes da análise, o que pode ter ocasionado uma desagregação das moléculas causadas pelo cisalhamento durante o processo de filtração.

A dispersão ( $\mathfrak{D}$ ) que é razão entre  $M_w/M_n$ , é uma estimativa da dispersão da massa molar do polímero e foi obtida através do detector de espalhamento de luz estático a  $90^\circ$  e foi de 1,8 para a XGT nativa, para os produtos oxidados foi de 1,4 para  $XGT_{oxi\ pH9}$ ,  $XGT_{oxi\ pH7}$  de 2,0,  $XGT_{oxi\ pH5}$  de 2,1 e para  $XGT_{sem\ TEMPO}$  de 1,7.

A **Figura 24** mostra o perfil de eluição no detector de espalhamento de luz estático a  $90^\circ$  e observa-se um perfil homogêneo e unimodal para as amostras avaliadas nas diferentes condições de pH (9, 7 e 5) e uma distribuição bimodal para  $XGT_{sem\ TEMPO}$ .



**FIGURA 24.** PERFIL DE ELUIÇÃO DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS  $XGT_{oxi\ pH9}$ ,  $XGT_{oxi\ pH7}$ ,  $XGT_{oxi\ pH5}$  E  $XGT_{oxi\ pH9\ em\ TEMPO}$  UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A  $90^\circ$  (SLS) OBTIDOS POR SEC.

Os valores de recuperação indicam a percentagem de detecção do RI, que fornece um valor da concentração presente na amostra analisada, para a amostra de XGT nativa foi de 95%, 97% para XGToxi pH9, 93% para XGToxi pH7, 96% para XGToxi pH5 e 92% para XGTsem TEMPO.

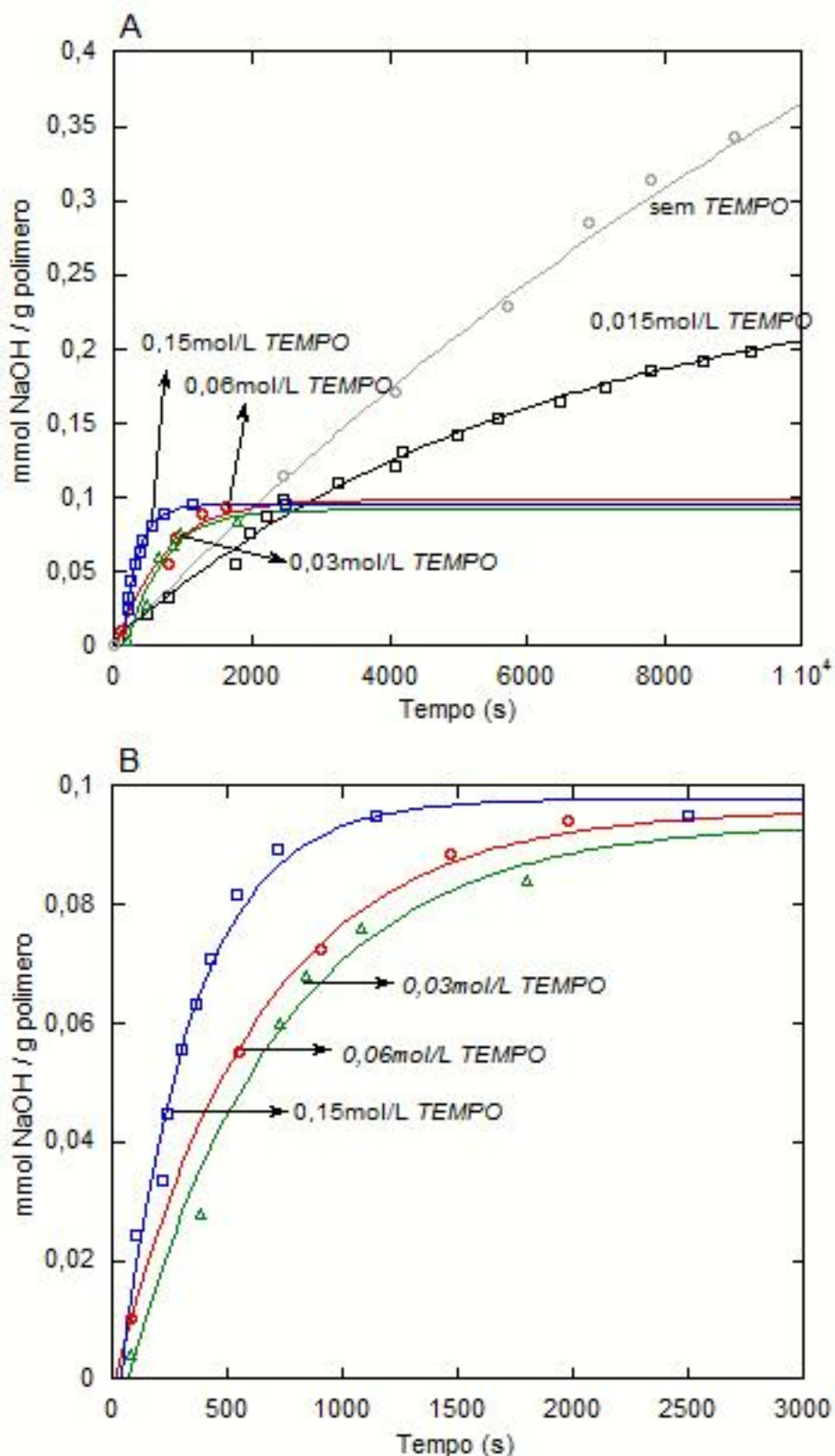
#### 4.3.2. EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR TEMPO

Para verificar a influência do catalisador TEMPO sobre a degradação do polímero durante a reação de oxidação, foram realizados experimentos com diferentes concentrações do catalisador. Os dados são apresentados na **Figura 25A** e na **Tabela 9** onde observa-se que com o aumento da concentração do catalisador de 0,015 mol.L<sup>-1</sup> para 0,030, 0,060 e 0,150 mol.L<sup>-1</sup> há um aumento da constante de velocidade, em contrapartida o grau de oxidação é praticamente o mesmo. A **Figura 25B** mostra uma ampliação das curvas de titulação com concentração do catalisador de 0,030, 0,060 e 0,150 mol.L<sup>-1</sup>.

**TABELA 9.** RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO A pH9 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CATALISADOR TEMPO.

AMOSTRA	$10^{-4} k$ (s <sup>-1</sup> )	Grau de Oxidação (mmol.g <sup>-1</sup> )	R
XGT <sub>sem TEMPO</sub>	0,58	0,831	0,997
XGT <sub>0,015mol/L TEMPO</sub>	1,62	0,255	0,998
XGT <sub>0,03mol/L TEMPO</sub>	18,8	0,092	0,976
XGT <sub>0,06mol/L TEMPO</sub>	34,2	0,097	0,998
XGT <sub>0,15mol/L TEMPO</sub>	45,7	0,095	0,998

**k** – constante de velocidade assumido cinética de primeira ordem **R** – desvio padrão



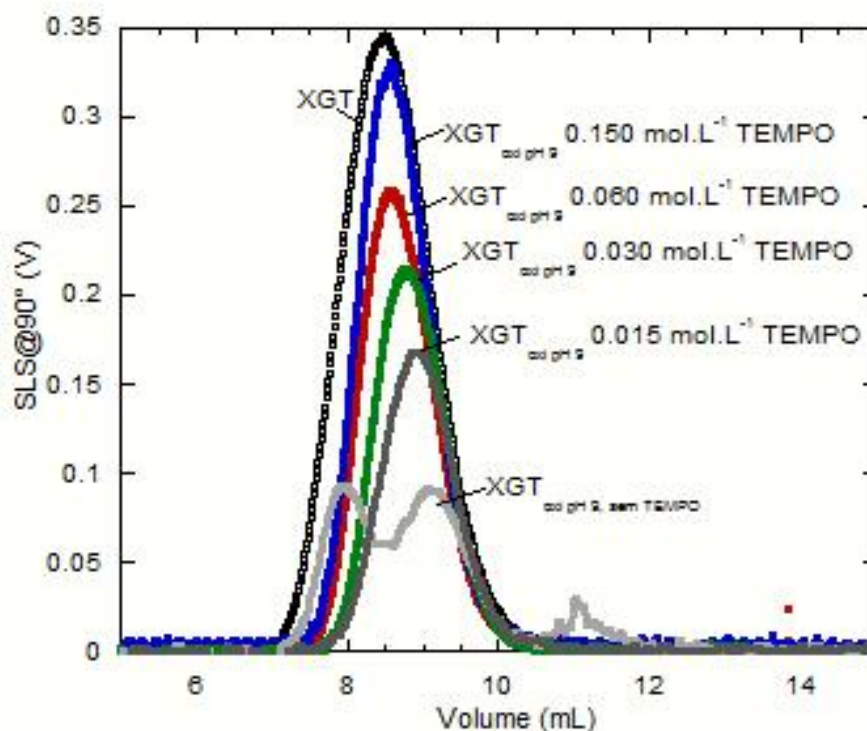
**FIGURA 25.** RESULTADO DO GRAU DE OXIDAÇÃO (MMOL COOH/g DE POLÍMERO) OBTIDO POR TITULAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO DE XGT A pH 9 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CATALISADOR TEMPO, XGT<sub>sem TEMPO</sub>, XGT<sub>0,015mol/L TEMPO</sub>, XGT<sub>0,03mol/L TEMPO</sub>, XGT<sub>0,06mol/L TEMPO</sub>, XGT<sub>0,15mol/L TEMPO</sub> **(A)** E AMPLIAÇÃO DAS CURVAS DE TITULAÇÃO PARA XGT<sub>0,03mol/L TEMPO</sub>, XGT<sub>0,06mol/L TEMPO</sub>, XGT<sub>0,15mol/L TEMPO</sub> **(B)**.

Nas diferentes concentrações do catalisador *TEMPO* houve uma dependência em termos de constante de velocidade para as reações de oxidação da XGT, os dados são mostrados na **Tabela 9**. A constante de velocidade para a reação sem o *TEMPO* foi de  $0,58 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , com 1x a concentração de *TEMPO* foi de  $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , com o aumento da concentração do catalisador houve um aumento significativo da constante de velocidade para  $18,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para a reação com 2x a concentração do catalisador, de  $34,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e  $45,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para 4x e 10x a concentração do catalisador, respectivamente.

Como se observa nas **Figuras 25** e na **Tabela 9** o grau de oxidação é praticamente constante quando se aumenta a concentração do catalisador *TEMPO* em 2x, 4x e 10x sendo de 0,092, 0,097 e 0,095  $\text{mmol.g}^{-1}$ , respectivamente, quando comparada a reação sem *TEMPO* de 0,831  $\text{mmol.g}^{-1}$  e para 1x a concentração do catalisador de 0,255  $\text{mmol.g}^{-1}$ . Isso é um indício de que o aumento da concentração do catalisador *TEMPO* no meio reacional diminui a oxidação não seletiva na cadeia do polissacarídeo, além de reduzir a degradação do polímero provocada pelas espécies reativas de oxigênio, conforme observado nos resultados de SEC (**FIGURA 26**). Foram realizadas análises de SEC dos produtos final das reações (**TABELA 10**) para verificar o grau de degradação polimérica. O perfil de eluição no detector de espalhamento de luz estático a  $90^\circ$  (**FIGURA 26**) mostra um perfil homogêneo e unimodal para as todas as amostras avaliadas quanto ao aumento da concentração de *TEMPO*.

Foi observado que houve uma diminuição na degradação com o aumento da concentração do catalisador *TEMPO*. A massa molar da XGT nativa era de  $4,8 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  e para a reação sem *TEMPO* a massa foi reduzida para  $1,3 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , uma redução de 73%. Para a reação com concentração de  $0,015 \text{ mol.L}^{-1}$  do catalisador *TEMPO* a massa molar diminuiu para  $3,1 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , uma redução de 35%. Quando a concentração do catalisador *TEMPO* foi aumentada para  $0,030 \text{ mol.L}^{-1}$  a massa molar reduziu para  $3,6 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  e para  $4,1 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  quando a concentração do catalisador era de  $0,060 \text{ mol.L}^{-1}$ , uma redução de 25% e 14% respectivamente. Com a concentração do catalisador *TEMPO* de  $0,150 \text{ mol.L}^{-1}$ , observou-se uma menor redução da massa molar de  $4,4 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , representando apenas 8% da massa molar da XGT nativa.





**FIGURA 26.** PERFIL DE ELUIÇÃO DOS PRODUTOS OXIDADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CATALISADOR *TEMPO*,  $XGT_{oxi\ pH9\ sem\ TEMPO}$ ,  $XGT_{oxi\ pH9\ 0,015\ mol.L^{-1}\ TEMPO}$ ,  $XGT_{oxi\ pH9\ 0,030\ mol.L^{-1}\ TEMPO}$ ,  $XGT_{oxi\ pH9\ 0,060\ mol.L^{-1}\ TEMPO}$  E  $XGT_{oxi\ pH9\ 0,150\ mol.L^{-1}\ TEMPO}$  UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A 90° (SLS) OBTIDOS POR SEC.

**TABELA 10.** RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT NATIVA E DOS PRODUTOS OXIDADOS NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *TEMPO*.

AMOSTRA	$M_w$ ( $10^5\ g.mol^{-1}$ )	$R_g^*$ (nm)	$\bar{D}$	Rec (%)
XGT	4,8	39	1,8	95
$XGT_{sem\ TEMPO}$	1,3	9	1,7	92
$XGT_{0,015mol/L\ TEMPO}$	3,1	12	1,4	97
$XGT_{0,03mol/L\ TEMPO}$	3,6	18	1,6	96
$XGT_{0,06mol/L\ TEMPO}$	4,1	26	1,5	94
$XGT_{0,15mol/L\ TEMPO}$	4,4	30	1,5	97

$M_w$  - massa molar média em massa,  $R_g^*$  - raio de giro obtido pela equação de Zimm (**EQUAÇÃO 5**)  
 $\bar{D} = M_w/M_n$  - dispersão, **REC** – recuperação cromatográfica.

Também ocorreu uma diminuição no valor de  $R_g^*$  da XGT nativa de 39 nm, para 12 nm na  $XGT_{0,015\text{mol/L TEMPO}}$ , mas à medida que se aumentava a concentração do catalisador *TEMPO* o valor de  $R_g^*$  foi aumentando para 18 nm para  $XGT_{0,03\text{mol/L TEMPO}}$ , 26 nm para  $XGT_{0,06\text{mol/L TEMPO}}$  e 30 nm para  $XGT_{0,15\text{mol/L TEMPO}}$ .

A  $\bar{D}$  para a XGT nativa é de 1,8 e para  $XGT_{0,015\text{mol/L TEMPO}}$  é de 1,4, para  $XGT_{0,03\text{mol/L TEMPO}}$  e para  $XGT_{0,06\text{mol/L TEMPO}}$  é de 1,6 e para  $XGT_{0,15\text{mol/L TEMPO}}$  é de 1,5.

Os valores de recuperação para a amostra de XGT nativa foi de 95%, 97% para  $XGT_{0,015\text{mol/L TEMPO}}$ , 96% para  $XGT_{0,03\text{mol/L TEMPO}}$ , 94% para  $XGT_{0,06\text{mol/L TEMPO}}$  e 97% para  $XGT_{0,15\text{mol/L TEMPO}}$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM ENDOGLUCANASE

Embora o mecanismo de degradação enzimática da XG seja relativamente bem caracterizado, detalhes importantes da atuação da enzima sobre a cadeia do polímero permanecem pouco compreendidos. Uma análise detalhada no mecanismo de atuação da enzima sobre a XG em tempo real pode fornecer novos *insights* sobre a formação dos oligômeros durante a reação de hidrólise, bem como informações sobre o contexto em que ela ocorreu. Este conhecimento de análise em tempo real pode ajudar a explicar quais os oligossacarídeos que apresentam maior e menor susceptibilidade a hidrólise enzimática.

Neste trabalho foi utilizada a enzima EGII, que é responsável por hidrolisar randomicamente a cadeia polimérica da XG, clivando ligações  $\beta$ -D-glucopiranosose ligadas (1→4) da cadeia do polissacarídeo. Como produto da ação da EG sobre polissacarídeo há a liberação de oligossacarídeos com diversos graus de polimerização. Sua atividade catalítica pode ser acompanhada através da diminuição da viscosidade do meio, decorrente da diminuição de massa molar média do polissacarídeo. Essa atuação também depende do grau de substituição da cadeia principal da XG e da presença de galactose na cadeia lateral, que limita a interação da enzima com o seu sítio ativo, reduzindo assim a velocidade da degradação enzimática, devido à formação de oligômeros resistentes à ação da EGII (VINCKEN, BELDMAN, VORAGEN, 1997). Estudos já realizados da hidrólise com enzima EGII mostram que a estrutura de XG apresenta um padrão estrutural de oligossacarídeos semelhantes, composto basicamente pelos oligossacarídeos: XXXG, XLXG, XXLG e XLLG. As diferenças entre as proporções de oligossacarídeos de XGT e XGJ foram previamente identificadas por Freitas *et al.*, (2005) e Tiné, Cortelazzo e Buckeridge (2000).

Resultados semelhantes foram encontrados nas alíquotas retiradas durante a reação de hidrólise em tempo real por análises HPAEC, onde foi observada a

sequência de formação de oligossacáridos para as amostras de XGs hidrolisadas com EGII em função do tempo de hidrólise (**TABELA 4**).

A hidrólise da XGT e XGJ com EGII em diferentes concentrações de enzima forma uma mistura de oligossacarídeos e agregados. A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos por HPAEC dos oligossacarídeos formados a partir da reação de XGT e XGJ com EGII  $0,009 \text{ U.mL}^{-1}$ . Observou-se que a proporção de oligossacarídeos formados durante os primeiros minutos da reação mantiveram-se constante até 140 min, em comparação com os valores dos oligossacarídeos formados na reação de hidrólise total de 24 h, sendo observado em ambas às amostras de XG. O padrão do perfil cromatográfico dos oligossacarídeos foi diferente para a hidrólise em 24 h para XGT (**FIGURA 13A**) e XGJ (**FIGURA 13B**), se comparado ao tempo curto de hidrólise (140 min) onde há formação de 1 a 3 unidades de oligossacarídeos que são mais resistentes à hidrólise enzimática, gerando um primeiro processo de degradação, com uma cinética de primeira ordem. Os oligossacarídeos com 2 ou 3 unidades são completamente degradados a oligossacarídeos (**FIGURA 2**), apenas após 24 horas de degradação. Pode-se observar que o aumento no tempo de hidrólise aumenta a eficiência da reação.

A atividade enzimática da EG possui condições ótimas para atuação e encontra-se em sua maioria acima de  $40^\circ\text{C}$  e valores de pH entre neutros e moderadamente ácidos (QIN *et al.*, 2008; WOEHL *et al.*, 2010). Em água pura a hidrólise enzimática da celulose ocorre espontaneamente, porém, de forma mais lenta (HEILER, MENDGEN, DEISING, 1993). Assim, é possível que a cinética de degradação observada para as XG em estudo, também possa ser influenciada pelo solvente utilizado e, possivelmente, de forma mais lenta, uma vez que os experimentos apresentados foram realizados em água.

Trabalhos prévios demonstraram que a XGJ é 1 nm mais rígida que a XGT, o que pode contribuir adicionalmente para as diferenças de constante de velocidade ( $\text{s}^{-1}$ ) observadas (FREITAS *et al.*, 2005). O teor de galactose, bem como a sua posição nos oligossacarídeos também pode influenciar nas diferentes constantes de velocidade observadas.

Utilizando o detector de índice de refração (RI) no TDSLS-vis, que é diretamente proporcional a concentração da solução, observou-se que durante a

reação o sinal do RI manteve-se constante, o que sugere que não houve variação da concentração de polissacarídeo no reator durante toda a reação enzimática, considerando-se que o  $dn/dc$  do produto de hidrolisado também pouco variou durante a cinética enzimática. O sinal do viscosímetro diminuiu após adição da enzima (**FIGURA 11**), praticamente retornando aos valores de linha de base do solvente, o que sugere que a cadeia foi degradada a oligômeros, como observado nas análises por SEC.

Os resultados de HPAEC mostram que a série de oligossacarídeo com composição XLXG está presente apenas nas amostras de XGT. Na fração XLLG + XXXXG, o XXXXG está ausente nas amostras de XGT, sendo esta encontrada somente nas amostras XGJ, e apenas estas apresentam formação de oligossacarídeos com cadeia principal de pentaglucose (BUCKERIDGE *et al.*, 1997). Observou-se que a razão das frações de oligossacarídeos formados é independente da concentração de enzima utilizada.

A proporção de oligossacarídeos se manteve praticamente constante durante os 140 min de análise em tempo real, com predominância de formação de oligossacarídeos com xilose e glucose na cadeia. Os oligossacarídeos que apresentam substituição de galactose se formam mais lentamente, isto se deve ao impedimento estérico causado pela presença de galactose em posições vicinais a glucose não substituída, inibindo a atuação da enzima. Mas observa-se que houve uma alteração nas proporções desses oligossacarídeos nas alíquotas das reações em 24 h onde prevaleceu a formação do oligossacarídeo XLLG para sementes de tamarindo e XXLG para sementes de jatobá.

O mais interessante apresentado neste trabalho é que se observou que a galactose localizada a duas unidades distantes da glucose não substituída (XLXG, XLLG e XXLXG), onde a enzima consegue atuar, foi mais significativa na inibição da formação de oligossacarídeos do que quando a galactose foi encontrada em posição vicinal a glucose não substituída, ou seja, XXLG ou XXXLG. A presença da galactose na cadeia lateral e a sua influência já fora descrita anteriormente por Freitas *et al.* (2005); Silva-Tiné, De Lima, Buckeridge, (2003) e Buckeridge *et al.* (1997) mas não em termos da sua posição. Assim, tem-se que independente dos oligossacarídeos serem constituídos por tetra ou penta glucose na cadeia principal, a galactose é determinante na formação de

oligômeros resistentes à hidrólise enzimática, principalmente, a localizada a duas unidades de distância do ponto de hidrólise, ou seja, da extremidade redutora do polissacarídeo.

De Alcântara, Dietrich e Buckeridge (1999) mostraram a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase sobre XG de *Copaifera langsdorffii* e observaram a formação de galactose, glucose e xilose livres, mas nenhuma galactose livre foi observada durante a atuação da endoglucanase sobre a xiloglucana, formando apenas os oligossacarídeos. Os autores sugeriram que a presença e posição da galactose na estrutura do polissacarídeo modula a ação da enzima endoglucanase. Crombie *et al.* (1998) estudaram a atuação de quatro hidrolases:  $\beta$ -galactosidase, endo (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucanase (ou XET),  $\alpha$ -xilosidade e  $\beta$ -glucosidase sobre XG de *Tropaeolum majus* e observaram que a presença da galactose na extremidade não redutora dos oligossacarídeos inibe a atuação da  $\beta$ -glucosidase na formação dos oligossacarídeos GLXG e GLLG, mas não em GXLG e GXXG. Assim sendo, a presença da galactose distante duas posições da extremidade redutora seria responsável por um impedimento estérico e portanto, essencial para mobilização da enzima endoglucanase sobre XG.

Na **Figura 11**, o sinal do SLS apresentou o mesmo fenômeno após a adição de EGII para ambas as amostras e em diferentes concentrações de enzima. Onde se observou uma diminuição na massa molar aparente ( $M_{wapp}$ ) do polímero. Como o espalhamento de luz é diretamente proporcional a  $M_{wapp}$  do polímero, isso sugere a degradação do polímero em cadeias menores. Estes pequenos fragmentos não espalham a luz e, por conseguinte, o sinal diminui. Na **Figura 12** está representado que, imediatamente após a adição da enzima, os valores de  $L_p$ ,  $R_g$  e  $M_w$  diminuíram em ambas as amostras, indicando a efetividade da atuação da EGII sobre a XG.

A diferença entre os valores de massa residual para ambas as amostras obtidas em tempo real e através dos resultados das análises de SEC das alíquotas sugere a formação de agregados durante a hidrólise e que podem ter contaminado os experimentos de TDSLS-vis. Estes agregados foram provavelmente desfeitos ou retidos nas análises das alíquotas durante a filtração com membrana de 0,22  $\mu$ m realizada antes das análises por SEC. Mkedder *et al.*

(2013) confirmaram por análises de AFM e DLS que os oligossacarídeos de XG produzidos por ação de EGII se associam e formam agregados.

Assim, a utilização dos dados viscosimétricos nos experimentos de TDSLS-vis mostrou-se mais interessante para avaliação dos parâmetros cinéticos e macromoleculares que o espalhamento de luz estático, uma vez que o detector viscosimétrico é menos sensível a presença de agregados moleculares que o espalhamento de luz.

## 5.2. OXIDAÇÃO COM CATALISADOR *TEMPO*

Nas diferentes condições de pH estudadas para a reação de oxidação da XGT com *TEMPO*, observou-se que a constante de velocidade de reação é menor para os pH 7 e pH 5, quando comparada ao pH 9, isso se deve a menor eficiência de oxidação do polissacarídeo, devido principalmente na formação de alcóxidos em meio alcalino. O grau de oxidação total do polissacarídeo apresentou a mesma tendência da constante de velocidade ( $k$ ), onde em pH 9 foi observada uma maior formação de carboxilato se comparado aos pH 7 e pH 5 (**FIGURA 14**).

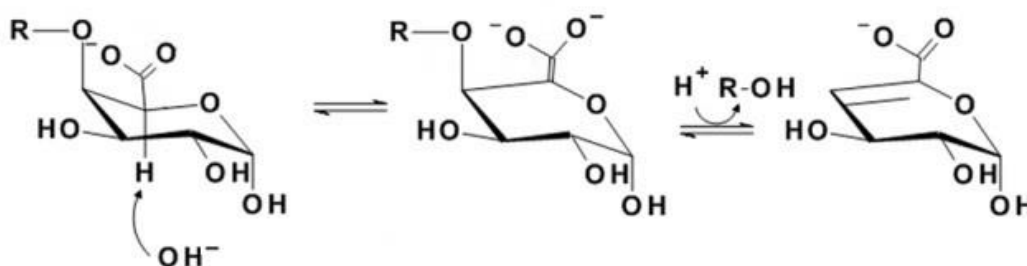
Para a reação sem o catalisador *TEMPO* a pH 9, contendo apenas a XGT dispersa em uma solução de NaClO/NaBr foi observada uma constante de velocidade maior que em pH 7 e pH 5, mas inferior ao pH 9 na presença do catalisador *TEMPO* (**TABELA 5**). Em contrapartida, apresentou maior conversão do álcool a carboxilato, indicando que mesmo na ausência do catalisador *TEMPO*, o polissacarídeo é oxidado de forma não seletiva pelas espécies reativas de oxigênio (NaClO/NaBrO) presente no meio reacional.

Não foram reportados na literatura reação de oxidação sem o *TEMPO*, porém estudos variando a quantidade de NaClO no sistema *TEMPO*/NaClO/NaBr foram avaliados e demonstraram que aumentando a quantidade de hipoclorito no meio reacional o grau de oxidação é proporcionalmente maior (XU *et al.*, 2014; MILANOVIC *et al.*, 2012).

Durante a reação de oxidação foi observado que ocorreu degradação do polissacarídeo com redução da massa molar em todas as reações estudadas, de forma mais acentuada para a reação sem o catalisador *TEMPO*. A degradação polimérica está descrita em literatura para as reações de oxidação mediadas com *TEMPO*, utilizando-se brometo de sódio e hipoclorito de sódio como um catalisador adicional e *TEMPO* como oxidante primário (WATANABE *et al.*, 2014; MILANOVIC *et al.*, 2012; ISOGAI, SAITO, FUKUZUMI, 2011; de SOUZA *et al.*, 2011; LAVAZZA *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2010; DELATTRE *et al.*, 2009; HIROTA *et al.*, 2009).

A redução de massa molar do polissacarídeo pode ter ocorrido através de dois processos: devido a  $\beta$ -eliminação, que é uma forma de despolimerização que ocorre em condições alcalinas moderadas e devido às espécies reativas de oxigênio (NaClO/NaBrO).

A presença de um ácido ou éster no C-6 do polissacarídeo contribui para a acidificação do hidrogênio do C-5. Este hidrogênio é desprotonado por uma base resultando na formação de uma dupla ligação entre C4-C5 (**FIGURA 27**), com eliminação do ligante do carbono  $\beta$  (C-4 do carboidrato), gerando um açúcar redutor e um derivado de carboidrato insaturado (ANET, 1964)



**FIGURA 27.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE  $\beta$ -ELIMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEO.

**FONTE:** ADAPTADO DE ABBOTT, GILBERT E BORASTON (2010).

A redução de massa molar do polissacarídeo também pode estar associada a espécies reativas de oxigênio (NaClO/NaBrO) que podem causar despolimerização oxidativa de polissacarídeos mesmo na presença do catalisador *TEMPO*. É possível que estas espécies reativas formadas no meio reacional



causem despolimerização da cadeia com formação de carbonos redutores (C-1) livres (aldeídos) que podem sofrer oxidação gerando ácido carboxílico (DUAN & KASPER, 2011). Assim, não se pode descartar que a extensiva oxidação do polissacarídeo, de forma não seletiva, possa ter contribuído para processos de degradação da cadeia polimérica, como observado na reação sem a presença do *TEMPO*.

Em nossos experimentos, descritos neste trabalho foi demonstrado que o *TEMPO* compete com o polissacarídeo durante a reação de oxidação pelo agente oxidante (NaClO/NaBr). Assim, o catalisador *TEMPO* não apresenta apenas funções catalíticas, mas também protege o polissacarídeo de degradações induzidas por espécies reativas de oxigênio. É a primeira vez em literatura em que é atribuída ao *TEMPO* uma função diferente das funções clássicas de catalisador da reação de oxidação. Tal observação só pode ser determinada a partir da avaliação em tempo real, nos experimentos com e na ausência do catalisador *TEMPO*.

Assim, a adição mesmo que em baixas concentrações de *TEMPO* inibe a despolimerização do polissacarídeo durante o processo oxidativo. Então, além de mediar à oxidação seletiva de álcool primário a carboxilato, o catalisador primário da reação teria uma função de proteger o polissacarídeo de uma degradação por espécies reativas de oxigênio não controladas que geram produtos de menor massa molar. Essa hipótese, que será discutida mais adiante, foi confirmada nos experimentos onde aumentando-se a concentração do catalisador *TEMPO* o grau de degradação foi significativamente reduzido.

Para todas as condições de pH avaliadas observou-se que durante o monitoramento em tempo real das reações a  $M_w$  foi diminuindo gradativamente, indicando que simultaneamente ao processo oxidativo o polímero estava sofrendo degradação (**FIGURA 15**). Os dados viscosimétricos apresentaram a mesma tendência, ocorreu uma redução da viscosidade do material em função do grau de oxidação, porém de forma mais acentuada. Isso se deve a não interferência dos agregados moleculares formados no detector viscosimétrico (**FIGURA 16**). Quando se compara o  $R_g^*$  obtido por SLS e  $R_g^{**}$  obtido por viscosimetria, pode-se observar que, para uma mesma amostra, os resultados são diferentes

dependendo do método de análise, confirmando assim a presença de agregados que poluíram os dados de SLS (**TABELA 6**).

Assume-se que há a formação de agregados em solução, e apesar da limitação do SLS, os demais detectores acoplados em série ao sistema, como o viscosímetro, polarímetro e DLS, forneceram dados complementares indicando e corroborando nas mudanças conformacionais observadas.

O detector de DLS foi acoplado ao sistema, este detector é usualmente utilizado para análise de polissacarídeos, mas esta é a primeira vez que o mesmo foi conectado ao sistema ACOMP. E os dados obtidos mostram que ocorre uma queda nos valores de  $R_h$  durante a reação, indicando que o volume hidrodinâmico é alterado assim que inicia o processo oxidativo

O processo de mutarrotação se refere à mudança da rotação ótica do carboidrato, que difere um do outro somente na configuração do carbono anomérico (C-1). Observou-se que ocorreu alteração de forma gradativa da rotação ótica durante as reações de oxidação para todas as condições de pH estudadas, devido a conversão do álcool primário do C-6 a ácido carboxílico e também devido ao processo de degradação que gera novos carboidratos na forma livre (oligômeros), e estes apresentam rotações diferentes e são menores que as do polissacarídeo nativo (**FIGURA 17**).

Durante o monitoramento em tempo real das reações de oxidação, foram observadas mudanças conformacionais na estrutura do polissacarídeo e estes dados foram confirmados através da caracterização do produto final por ACM e SEC, indicando que ocorreu a formação do polieletrólito.

A análise dos produtos oxidados obtidos mostrou que houve uma interferência devido à presença de agregados no SLS, este detector não respondeu como esperado. Esperava-se que o sinal de SLS fosse concordante com os obtidos por Savi *et al.* (2015), que observaram para a xantana um aumento da intensidade de luz espalhada e diminuição da viscosidade do polímero com aumento da concentração de sal, devido a redução do volume excluído. Sorci e Reed (2002) observaram o mesmo comportamento para o ácido hialurônico. Porém, a XG apresentou o mesmo comportamento observado por Freitas *et al.* (2010) para a quitosana, onde houve um baixo padrão de

espalhamento de luz e uma queda na viscosidade do material. Devido a esta limitação do SLS, foram utilizados os dados de viscosimetria para a obtenção dos parâmetros macromoleculares da modificação química.

O produto final oxidado (polieletrólito) foi avaliado quanto à influência de adição de íons. Sorci e Reed (2002) observaram uma queda na viscosidade e um aumento no SLS quando da adição de sal, os dados de  $Kc/R_0$  em função da concentração de sal fizeram com que o espalhamento de luz do material analisado se alterasse. A partir destes dados foram obtidos  $A_2$  em função da concentração de sal. Eles compararam a dependência do  $A_2$  com os componentes eletrostáticos e hidrodinâmicos na cadeia polimérica e verificaram a contribuição de cada um desses componentes para o sistema. Para o sistema utilizado neste trabalho foi observado um comportamento oposto ao reportado, utilizando dados de  $Kc/R_0$  em função da concentração de sal, onde estes dois componentes, tanto o componente eletrostático como componente hidrodinâmico atuam em sentidos opostos, com aproximadamente a mesma intensidade. Teoricamente, o aumento da concentração de íons em solução deveria reduzir o volume excluído da molécula com contração da cadeia polimérica, devido a interações eletrostáticas e reduzir a qualidade termodinâmica do solvente, causando uma contração da cadeia.

Uma explicação mais plausível para a situação observada é simplesmente que os agregados moleculares formados em solução, poluíram tanto o espalhamento de luz, que não geraram variações significantes no detector. O mecanismo proposto pode se dar devido a contração da molécula, causado pela presença de sal, com redução de volume excluído, que aumentam a intensidade de luz espalhada, ao mesmo tempo em que agregados moleculares eram desfeitos na presença de sal, com redução de luz espalhada, e como resultado final observou-se uma pequena variação do espalhamento de luz (**FIGURA 19**).

Para o detector viscosimétrico (**FIGURA 20**) este efeito da diminuição do volume excluído e efeito da contração da cadeia causada pela redução do valor do  $A_2$  são causados pelo aumento da concentração de sal. Para o detector SLS, observou-se o contrário, onde ocorre um aumento do  $A_2$  e geraram dados opostos quando o  $A_2$  foi determinado a partir de dados viscosimétricos. A explicação para

tal evento pode estar associada novamente a influência dos agregados moleculares nos experimentos de espalhamento de luz, em comparação com os experimentos com viscosímetro.

Novamente, o detector viscosimétrico é menos susceptível a presença de agregados moleculares, e isso pode também justificar as diferenças de  $R_g^{**}$  viscosimétrico (**FIGURA 21**) e  $R_g^*$  obtido por SLS, confirmando novamente que o detector viscosimétrico é o melhor detector para análises em tempo real de polissacarídeos.

Quando o produto final é avaliado por viscosimetria, para avaliação do efeito do polieletrólito ocorre que, com o aumento da concentração de sal, há uma diminuição do valor de  $A_2$ , indicando que o polímero em água se encontra em um bom solvente, em tal situação, a cadeia encontra-se expandida em função do aumento do volume excluído. Com aumento da concentração de sal, o valor de  $A_2$  reduz, aproximando-se de um solvente  $\theta$ , com redução de volume excluído, resultado esperado para dados de  $A_2$  de um polieletrólito em função da concentração de sal no meio (**FIGURA 22**).

Pela primeira vez foi acoplado um polarímetro no sistema ACM (**FIGURA 23**). Este detector não é sensível à presença de agregados e/ou presença de íons em solução e pode informar mudanças conformacionais da cadeia polimérica. A quiralidade do polissacarídeo não se alterada sem que tenha ocorrido quebra de ligações glicosídicas, ou seja, a configuração polimérica não pode ter sido alterada e, as alterações observadas na rotação ótica sugerem modificação na cadeia ou, uma nova configuração do novo C-1 livre que é formado após a despolimerização do carboidrato.

Assim, uma possibilidade é que, durante a reação em tempo real a rotação ótica foi alterada se comparado com o polissacarídeo nativo, mantendo o mesmo tipo de ligação química, mas alterando o carboidrato, com alteração da rotação ótica. Assim, a presença de ácido glucurônico ou ácido galacturônico, ao invés de apenas glucose e galactose devem alterar a rotação ótica observada. Isbell e Frush (1943) observaram para a  $\beta$ -D-galactose e  $\beta$ -D-galacturônico uma queda de 36% na rotação ótica durante oxidação para a mesma configuração ( $\beta$ ) dos derivados neutros e oxidados. Uma segunda possibilidade da alteração da

rotação ótica foi à geração de carboidratos livres em solução, que apresentam em equilíbrio, valores menores aos apresentados quando no polissacarídeo.

Os dados de  $L_p$  mostram que a rigidez da molécula foi alterada em função do grau de oxidação, indicando que o processo de oxidação gerou moléculas com menor segmento de cadeia, sendo assim mais rígida. A amostra  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  apresentou um valor extremamente baixo de  $L_p$  indicando que esta molécula apresenta segmentos de cadeia muito pequenos, o que pode ser mais um indício da degradação do polímero (**TABELA 7**).

Os dados de SEC mostram, que para as amostras oxidadas houve uma diminuição da massa molar do polímero, o que confirma a degradação do material em todas as condições de pH estudadas. Porém, para o produto oxidado na condição de pH 5, a degradação foi maior do que em pH 9 e pH 7. Nesta condição de pH ácido ocorre reações de forma não seletiva de grupos de álcoois secundário pelas espécies reativas, NaClO e NaBrO (**FIGURA 24A**). Quando a reação ocorre em condições alcalinas, pH 9,2 – 9,5, e temperaturas baixas, a seletividade da reação é maior que 95% (DE-NOOY *et al.*, 1995a, 1995b).

Para a reação sem a presença do catalisador *TEMPO*, observa-se uma distribuição bimodal (**FIGURA 24A**), onde a primeira fração indica a presença do polímero nativo apesar da baixa concentração detectada no RI (**FIGURA 24B**), ou seja, apenas um residual não quantificável do polímero inicialmente utilizado nas reações de oxidação, e outra fração de baixa massa molar no mesmo tempo de retenção que os demais produtos oxidados, indicando que na ausência do catalisador, além da extensiva degradação do polissacarídeo pode ter ocorrido oxidação de forma não seletiva, tanto em álcool primário quanto secundário. Observa-se ainda um terceiro pico na amostra  $XGT_{\text{sem TEMPO}}$  com tempo de retenção em 11,0 mL (**FIGURA 24A**), este pico de baixa massa molar refere-se a oligômeros do carboidrato que foram formados durante o processo degradativo.

Este comportamento foi observado para diferentes polissacarídeos por diversos autores (WATANABE *et al.*, 2014; MILANOVIC *et al.*, 2012; ISOGAI, SAITO, FUKUZUMI, 2011; de SOUZA *et al.*, 2011; LAVAZZA *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2010; TAMURA *et al.*, 2010; DELATTRE *et al.*, 2009; HIROTA *et al.*, 2009), onde para o sistema *TEMPO*/NaClO/NaBr observa-se degradação da cadeia

polimérica com redução de massa molar causadas pelas espécies reativas (NaClO/NaBrO). Bragd e Besemer (2000) reportam que mesmo na ausência de NaBr, o *TEMPO* se oxida a partir do hipoclorito de sódio formando o íon nitrozônio.

Para comprovar que a degradação do polímero se dá através dessas espécies reativas NaClO/NaBrO e que o *TEMPO* além de catalisador tem função de proteger o polissacarídeo da degradação por espécies reativas de oxigênio não controladas, funcionando como uma molécula de sacrifício no meio reacional, foram realizados experimentos aumentando-se a concentração do catalisador *TEMPO*, e observou-se que a degradação foi significativamente reduzida.

A constante de velocidade foi proporcionalmente maior à medida que a concentração do catalisador foi aumentada, porém o grau de oxidação foi praticamente constante independente da concentração de *TEMPO*. Em contrapartida, houve uma redução da degradação do polímero, indicando que as espécies reativas de oxigênio estão participando preferencialmente da conversão do catalisador *TEMPO* a íon nitrozônio do que degradando o polissacarídeo, ou seja, ocorre uma preferência para a reação de oxidação frente à degradação.

Sendo assim, o aumento da concentração de *TEMPO* está inibindo a despolimerização do polissacarídeo durante o processo oxidativo. O catalisador *TEMPO* além de mediar a oxidação seletiva, tem uma função de proteger o polissacarídeo de uma degradação não controlada por espécies reativas de oxigênio, gerando produtos de menor massa molar, o que redefine o papel do *TEMPO* no processo reacional.

Mesmo com o aumento da concentração do *TEMPO*, observou-se ainda, em menor proporção, alguma degradação do polissacarídeo. Esta degradação provavelmente se deve ao processo de  $\beta$ -eliminação que ocorre em meio alcalino, gerando como produtos um carboidrato redutor e um derivado de carboidrato insaturado, que não foram influenciados pelo aumento da concentração do *TEMPO* no reator.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Análises de caracterização físico-químicas das XGT e XGJ foram realizadas e confirmaram que se trata de um polissacarídeo homogêneo.

Foi realizada análise em tempo real da hidrólise enzimática com EGII para observar as características das XGs monitoradas por um sistema TDSLS-vis. A composição e estrutura dos oligômeros obtidos mostrou que a presença de galactose a duas unidades da glucose (local de ação da EGII), possui uma maior influência sobre a formação de oligossacarídeos, que a presença de galactose vicinal a glucose, ou mesmo a ausência de galactose.

Foi realizada a reação de oxidação em tempo real da XGT (ACOMP) para observar a modificação química com catalisador *TEMPO* e consequente formação de um polieletrólito (ACM) em diferentes condições de pH (9, 7 e 5) e sem a presença do catalisador *TEMPO* e em diferentes concentrações do catalisador. Os resultados mostraram que ocorre degradação do material, e esta degradação é acentuada quando o *TEMPO* é eliminado do processo oxidativo. Porém, com o aumento da concentração de *TEMPO* houve uma redução significativa da degradação por espécies reativas de oxigênio, sendo esta degradação atribuída ao processo de  $\beta$ -eliminação. O produto oxidado obtido apresenta características de polieletrólito, onde a adição de sal reduz o volume excluído e aproxima o solvente de um solvente  $\theta$ .

Comparativamente aos detectores de espalhamento de luz, o detector viscosimétrico mostrou-se promissor para análises químicas em tempo real para polissacarídeos, por reduzir as interferências de agregados moleculares, tanto na reação enzimática quanto na reação de oxidação seletiva.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. W., GILBERT, H. J., BORASTON, A. B. The Active Site of Oligogalacturonate Lyase Provides Unique Insights into Cytoplasmic Oligogalacturonate  $\beta$ -Elimination. ***Journal of Biological Chemistry***. v. 28, p. 39029-39038, 2010.

ALB, A. M., ENOHNYAKET, P., DRENSKI, M. F., HEAD, A., REED, A. W., REED, W. F. Online Monitoring of Copolymerization Involving Comonomers of Similar Spectral Characteristics. ***Macromolecules***. v. 39, n. 17, p. 5705-5713, 2006.

ALB, A. M., MIGNARD, E., DRENSKI, M. F., REED, W. F. In Situ Time-Dependent Signatures of Light Scattered from Solutions undergoing Polymerization Reactions. ***Macromolecules***. v. 37, n. 7, p. 2578-2587, 2004.

ANDRADE, C. AZERO, E. G., LUCIANO, L., GONÇALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans Extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum, ***International Journal of Biological Macromolecules***, v. 26, p.181-185, 1999.

ANET, E. 3-DEOXYGLYCOSULOSES (3-DEOXYGLYCOSONES) AND THE DEGRADATION OF CARBOHYDRATES. ***Advances in Carbohydrate Chemistry***. v. 19, n. p. 181-218, 1964.

ARRUDA, I. R. S.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; SANTOS, G. R. C.; SILVA, A. G.; MOURÃO, P. A. S.; CORREIA, M. T. S.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds. ***International Journal of Biological Macromolecules***. v. 73, n. p. 31-38, 2015.

AWAFO, V. A.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K. Evaluation of combination treatments of sodium hydroxide and steam explosion for the production of cellulase-systems by two *T. reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. ***Bioresource Technology***. v. 73, n. 3, p. 235-245, 2000.



BAYLY, E. E.; BROUSSEAU, J.-L.; REED, W. F. Continuous Monitoring of the Effect of Changing Solvent Conditions on Polyelectrolyte Conformations and Interactions. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**. v. 7, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

BRAGD, P. L.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Bromide-free *TEMPO*-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**. v. 328, n. 3, p. 355-363, 2000.

BUCKERIDGE, M. S.; CROMBIE, H. J.; MENDES, C. J. M.; REID, J. S. G.; GIDLEY, M. J.; VIEIRA, C. C. J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons, **Carbohydrate Research**, v. 303, n. 2, p. 233-237, 1997.

BUSATO, A. P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*, **Materials Science and Engineering: C**. v. 29, n. 2, p. 410-414, 2009.

CARPITA, N. C. AND MCCANN, M. C., Chapter 2 "The Cell Wall" In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds, American Society Plant Physiologists, Rockville, MD. 2000.

CARPITA, N. C., GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, **Plant Journal**, v. 3(1), p. 1–30, 1993.

CHAUVIN, F., ALB, A. M., BERTIN, D., REED, W.F. Kinetics and molecular weight evolution during controlled radical polymerization, **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 203(14), p. 2029–40, 2002.

CROMBIE, H. J., CHENGAPPA, S., HELLYER, A. AND REID, J. S. G. A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating-D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L) seedlings – purification, properties and characterization of a cDNA clone. **The Plant Journal**, v. 15, p. 27–38, 1998.

CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; PAULA, R. C. M. D.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with *TEMPO* reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 18, n. p. 85-92, 2007.

DAMÁSIO, A. R. L.; RIBEIRO, L. F. C.; RIBEIRO, L. F.; FURTADO, G. P.; SEGATO, F.; ALMEIDA, F. B. R.; CRIVELLARI, A. C.; BUCKERIDGE, M. S.; SOUZA, T. A. C. B.; MURAKAMI, M. T.; WARD, R. J.; PRADE, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. v. 1824, n. 3, p. 461-467, 2012.

DE ALCÂNTARA, P. H. N.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan mobilisation and purification of a (XLLG/XLXG) specific  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Copaifera langsdorffii*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 37, n. 9, p. 653-663, 1999.

DE ALCÂNTARA, P. H. N.; MARTIM, L.; SILVA, C. O.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. Purification of a  $\beta$ -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 44, n. 11-12, p. 619-627, 2006.

DE LIMA, D. U. and BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation, **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 2, p. 157-163, 2001.

DE SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. Oxidation and N-Alkylation at the C-6 Position of Galactomannan Extracted from *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* Seeds. **Macromolecular Symposia**. v. 299-300, n. 1, p. 66-73, 2011.

DELATTRE, C.; RIOS, L.; LAROCHE, C.; LE, N. H. T.; LECERF, D.; PICTON, L.; BERTHON, J. Y.; MICHAUD, P. Production and characterization of new families of polyglucuronic acids from *TEMPO*-NaClO oxidation of curdlan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 45, n. 5, p. 458-462, 2009.

DE-NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**. v. 269, n. 1, p. 89-98, 1995a.

DE-NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Selective oxidation of primary alcohols mediated by nitroxyl radical in aqueous solution. Kinetics and mechanism. **Tetrahedron**. v. 51, n. 29, p. 8023-8032, 1995b.

DE-NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H.; VAN DIJK, J. A. P. P.; SMIT, J. A. M. TEMPO-Mediated Oxidation of Pullulan and Influence of Ionic Strength and Linear Charge Density on the Dimensions of the Obtained Polyelectrolyte Chains. **Macromolecules**. v. 29, n. 20, p. 6541-6547, 1996.

DIN, N.; COUTINHO, J. B.; GILKES, N. R.; JERVIS, E.; KILBURN, D. G.; MILLER JR, R. C.; ONG, E.; TOMME, P.; WARREN, R. A. J. (1995). Interactions of cellulases from *Cellulomonas fimi* with cellulose. **Progress in Biotechnology**. STEFFEN B. PETERSEN, B. S. and SVEN, P., Elsevier. **Volume 10**: 261-270.

DRENSKI, M. F.; BRADER, M. L.; ALSTON, R. W.; REED, W. F. Monitoring protein aggregation kinetics with simultaneous multiple sample light scattering. **Analytical Biochemistry**. v. 437, n. 2, p. 185-197, 2013.

DRENSKI, M. F.; MIGNARD, E.; ALB, A. M.; REED, W. F. Simultaneous in-Situ Monitoring of Parallel Polymerization Reactions Using Light Scattering; A New Tool for High-Throughput Screening. **Journal of Combinatorial Chemistry**. v. 6, n. 5, p. 710-716, 2004.

DUAN, J., KASPER, D. L. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. **Glycobiology**. v.4, p. 401, 2011.

ENOHNYAKET, P.; KREFT, T.; ALB, A. M.; DRENSKI, M. F.; REED, W. F. Determination of Molecular Mass during online monitoring of copolymerization reactions, **Macromolecules**, v. 40, p. 8040-8049, 2007.

FLORENZANO, F., H., STRELITZKI, R., REED, W., F., Absolute online monitoring of polymerization reaction, **Macromolecules**, v. 31, p. 7226, 1998.

FLORY, P.J. **Principles of Polymer chemistry**. Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.

FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J. L. M. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, n. 4, p. 1636-1642, 2011.

FREITAS, R. A.; DRENSKI, M. F.; ALB, A. M.; REED, W. F. Characterization of stability, aggregation, and equilibrium properties of modified natural products; The case of carboxymethylated chitosans. **Materials Science and Engineering: C**. v. 30, n. 1, p. 34-41, 2010.

FREITAS, R. A.; GORIN, P. A. J.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, M. R. A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydrate Polymers**. v. 51, n. 1, p. 25-32, 2003.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; SIERAKOWSKI, M. R. Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds. **Thermochimica Acta**. v. 409, n. 1, p. 41-47, 2004.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, n. 4, p. 507-514, 2005.

FREITAS, R. A.; SPIER, V. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L.; CHASSENIEUX, C. Transient and quasi-permanent networks in xyloglucan solutions. **Carbohydrate Polymers**. v. 129, n. 0, p. 216-223, 2015.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.-P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MacLACHLAN, G. A.; McNEIL, M.; MORT, A.; REID, J. S. G.; SEITZ, H. U.; SELVENDRAN, R. R.; VORAGEN, A. G. J.; WHITE, A. R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Plant Physiology**, v. 89, p. 1-3, 1993.

GANTER, J. L. M. S.; SABBI, J. C.; REED, W. F. Real-time monitoring of enzymatic hydrolysis of galactomannans. **Biopolymers**. v. 59, n. 4, p. 226-242, 2001.

GAUCHE, C.; SOLDI, V.; FORT, S.; BORSALI, R.; HALILA, S. Xyloglucan-based diblock co-oligomer: Synthesis, self-assembly and steric stabilization of proteins. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, n. 2, p. 1272-1280, 2013.

GIZ A, KOC A, O, GIZ H, ALB A, M, REED W, F, Online monitoring of reactivity ratios, composition, sequence length, and molecular weight distributions during free radical copolymerization, **Macromolecules**, v. 35, p. 6557–71, 2002.

GRIGOREVSKI DE LIMA, A. L.; PIRES DO NASCIMENTO, R.; DA SILVA BON, E. P.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, n. 2, p. 272-277, 2005.

HAYASHI, T.; BABA, K.; OGAWA, K.; MITSUSHI, Y. Effect of degree of polymerization on the binding of xyloglucan to cellulose. **Plant Cell Physiology**. v. 35, n. 6, p. 893-899, 1994.

HEILER, S.; MENDGEN, K.; DEISING, H. Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiation-specifically. **Mycological Research**. v. 97, n. 1, p. 77-85, 1993.

HIROTA, M.; TAMURA, N.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Oxidation of regenerated cellulose with NaClO<sub>2</sub> catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions. **Carbohydrate Polymers**. v. 78, n. 2, p. 330-335, 2009.

ISELL, H., S., FRUSH, H., L. Ring structures and mutarotations of the modifications of d-galacturonic acid. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 31, p. 33-44, 1943.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**. v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011.

ISOGAI, T.; SAITO, T.; ISOGAI, A. *TEMPO* Electromediated Oxidation of Some Polysaccharides Including Regenerated Cellulose Fiber. **Biomacromolecules**. v. 11, n. 6, p. 1593-1599, 2010.

JO, T. A.; PETRI, D. F. S.; VALENGA, F.; LUCYSZYN, N.; SIERAKOWSKI, M. R. Thin films of xyloglucans for BSA adsorption. **Materials Science and Engineering: C**. v. 29, n. 2, p. 631-637, 2009.

JUNG, S.; SONG, Y.; KIM, H. M.; BAE, H.-J. Enhanced lignocellulosic biomass hydrolysis by oxidative lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) GH61 from *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 77, p. 38-45, 2015.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system, **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 69-75, 2003.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system, **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 69-75, 2003.

LAVAZZA, M.; FORMANTICI, C.; LANGELLA, V.; MONTI, D.; PFEIFFER, U.; GALANTE, Y. M. Oxidation of galactomannan by laccase plus TEMPO yields an elastic gel. **Journal of Biotechnology**. v. 156, n. 2, p. 108-116, 2011.

LI, Z.; SERELIS, A. K.; REED, W. F.; ALB, A. M. Online monitoring of the copolymerization of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate with styrene by RAFT. Deviations from reaction control. **Polymer**. v. 51, n. 21, p. 4726-4734, 2010.

LIMA-NISHIMURA, N.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M.-R, "Oligosaccharides derived from the xyloglucan from the seeds of *Hymenaea coubaril* var, *stilbocarpa*" International **Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

LUCYSZYN, N.; LUBAMBO, A. F.; ONO, L.; JÓ, T. A.; DE SOUZA, C. F.; SIERAKOWSKI, M. R. Chemical, physico-chemical and cytotoxicity characterisation of xyloglucan from *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard seeds. **Food Hydrocolloids**. v. 25, n. 5, p. 1242-1250, 2011.

MAHAJAN, H. S.; DESHMUKH, S. R. Development and evaluation of gel-forming ocular films based on xyloglucan. **Carbohydrate Polymers**. v. 122, n. p. 243-247, 2015.

MARTIN, S.; FREITAS, R. A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydrate Polymers**. v. 54, n. 3, p. 287-295, 2003.

MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. Degradabilidade de volumosos utilizando enzimas fibrolíticas. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 435-442, 2008.

MCFAUL, C. A.; DRENSKI, M. F.; REED, W. F. Online, continuous monitoring of the sensitivity of the LCST of NIPAM-Am copolymers to discrete and broad composition distributions. **Polymer**. v. 55, n. 19, p. 4899-4907, 2014.

MILANOVIC, J.; KOSTIC, M.; MILANOVIC, P.; SKUNDRIC, P. Influence of TEMPO-Mediated Oxidation on Properties of Hemp Fibers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 51, n. 29, p. 9750-9759, 2012.

MKEDDER, I.; TRAVELET, C.; DURAND-TERRASSON, A.; HALILA, S.; DUBREUIL, F.; BORSALI, R. Preparation and enzymatic hydrolysis of nanoparticles made from single xyloglucan polysaccharide chain. **Carbohydrate Polymers**. v. 94, n. 2, p. 934-939, 2013.

NEGAHDAR, L.; DELIDOVICH, I.; PALKOVITS, R. Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 184, n. p. 285-298, 2016.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**. v. 33, n. p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA JUNIOR, C, J, F, D.; BRAGA, M, R.; BUCKERIDGE, M, S, Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucana de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular, **Brazilian Journal of Botany**, v, 29, n, p, 391-397, 2006.

PICOUT, D. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; ERRINGTON, N.; HARDING, S. E. Pressure Cell Assisted Solubilization of Xyloglucans: Tamarind Seed Polysaccharide and Detarium Gum. **Biomacromolecules**. v. 4, n. 3, p. 799-807, 2003.

PIENS, K.; HENRIKSSON, A.-M.; GULLFOT, F.; LOPEZ, M.; FAURE, R.; IBATULLIN, F. M.; TEERI, T. T.; DRIGUEZ, H.; BRUMER, H. Glycosynthase activity of hybrid aspen xyloglucan *endo-transglycosylase* PttXET16-34 nucleophile mutants. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 5, n. 24, p. 3971-3978, 2007.

QIN, Y.; WEI, X.; SONG, X.; QU, Y. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum. **Journal of Biotechnology**. v. 135, n. 2, p. 190-195, 2008.

RAD, B. L.; YAZDANPARAST, R. Desorption of the cellulase systems of *Trichoderma reesei* and a *Botrytis* sp. from Avicel. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 9, p. 693-696, 1998.

REED, W. F. Automatic, Continuous Mixing Techniques for Online Monitoring of Polymer Reactions and for the Determination of Equilibrium Properties, ch, 20, pp, 589-622, **Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques**", 2nd Ed, Chi-san Wu, Ed., Marcel Dekker, 2003.

SAITO, T.; HIROTA, M.; TAMURA, N.; ISOGAI, A. Oxidation of bleached wood pulp by TEMPO/NaClO/NaClO<sub>2</sub> system: effect of the oxidation conditions on carboxylate content and degree of polymerization. **Journal of Wood Science**. v. 56, n. 3, p. 227-232, 2010.

SAVI-JUNIOR, R.; DE FREITAS, R. A.; SASSAKI, G. L.; KOOP, H. S.; SILVEIRA, J. L. M. Real-time monitoring of the change in stiffness of single-strand xanthan gum induced by NaCl. **Food Hydrocolloids**. v. 44, n. 0, p. 191-197, 2015.

SIERAKOWSKI, M. R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**. v. 49, n. 2, p. 167-175, 2002.



SIERAKOWSKI, M. R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**. v. 42, n. 1, p. 51-57, 2000.

SILVA-TINÉ, M, A.; DE LIMA, D, U.; BUCKERIDGE, M, S. Galactose branching modulates the action of cellulase on seed storage xyloglucans, **Carbohydrate Polymers**, v, 52, n, 2, p, 135-141, 2003.

SILVEIRA, J. L. M.; BRESOLIN, T. M. B. Pharmaceutical use of galactomannans. **Química Nova**. v. 34, n. p. 292-299, 2011.

SORCI, G. A., REED, W. F. Effect of ion type and valence on polyelectrolyte conformations and interactions, **Macromolecules**, 37, 554-565, 2004.

SORCI, G. A.; REED, W. F. Electrostatically Enhanced Second and Third Virial Coefficients, Viscosity, and Interparticle Correlations for Linear Polyelectrolytes. **Macromolecules**. v. 35, n. 13, p. 5218-5227, 2002.

TAMURA, N.; HIROTA, M.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Oxidation of curdlan and other polysaccharides by 4-acetamide-TEMPO/NaClO/NaClO<sub>2</sub> under acid conditions. **Carbohydrate Polymers**. v. 81, n. 3, p. 592-598, 2010.

TINÉ, M. A. S.; SILVA, C. O.; LIMA, D. U. D.; CARPITA, N. C.; BUCKERIDGE, M. S. Fine structure of a mixed-oligomer storage xyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Carbohydrate Polymers**. v. 66, n. 4, p. 444-454, 2006.

TINÉ, M, A, S.; CORTELAZZO, A, L.; BUCKERIDGE, M, S. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L, (*Leguminosae-Caesalpinoideae*), **Plant Science**, v. 154, n. 2, p. 117-126, 2000.

VINCKEN, J.-P.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? **Carbohydrate Research**. v. 298, n. 4, p. 299-310, 1997.

VINCKEN, J. P.; BELDMAN, G.; MESSEN, W. M. A.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of apple fruit xyloglucan by endoglucanase. **Carbohydrate Polymers**. v. 29, n. 1, p. 75-85, 1996.

WATANABE, E.; TAMURA, N.; SAITO, T.; HABU, N.; ISOGAI, A. Preparation of completely C6-carboxylated curdlan by catalytic oxidation with 4-acetamido-*TEMPO*. **Carbohydrate Polymers**. v. 100, n. 0, p. 74-79, 2014.

WITHERS, S. G.; RUPITZ, K.; STREET, I. P. 2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 17, p. 7929-7932, 1988.

WOEHL, M. A.; CANESTRARO, C. D.; MIKOWSKI, A.; SIERAKOWSKI, M. R.; RAMOS, L. P.; WYPYCH, F. Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**. v. 80, n. 3, p. 866-873, 2010.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 75-90, 1988.

XU, Q.; LI, W.; CHENG, Z.; YANG, G.; QIN, M. *TEMPO*/NaBr/NaClO-Mediated Surface Oxidation of Nanocrystalline Cellulose and Its Microparticulate Retention System with Cationic Polyacrylamide. **BioResources**.

ZIMM, B. H. The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High-polymer Solutions. **Journal Chemistry Physics**. v. 16, p. 1093–1099, 1948.

## ANEXOS

**ANEXO 1. RESULTADOS OBTIDOS POR SEC DA XGT E XGJ NATIVA E ALÍQUOTAS EM 10 E 140 MIN DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM EGII A 0,006 e 0,012 U.mL<sup>-1</sup>**

Amostra	[EGII] U.mL <sup>-1</sup>	Tempo (min)	M <sub>w</sub> (g.mol <sup>-1</sup> )	Đ	[η] (mL.g <sup>-1</sup> )	R <sub>g</sub> ** (nm)	Rec (%)	Massa Residual (%)
<b>XGT</b>	-	0	3,80x10 <sup>5</sup>	1,8	359,0	50,1	85	100,00
	0,006	10	5585	1,3	32,9	1,9	68	0,52
		140	4287	1,4	4,4	1,8	72	0,40
	0,012	10	3841	1,3	6,7	2,2	71	0,36
		140	3074	1,6	5,4	1,8	73	0,29
	-	0	5,05x10 <sup>5</sup>	1,4	410,0	56,0	82	100,00
<b>XGJ</b>	0,006	10	4422	1,1	3,4	4,8	86	0,30
		140	3429	1,2	2,8	1,5	79	0,23
	0,012	10	3706	1,1	4,5	1,6	87	0,25
		140	3190	1,4	2,8	1,4	78	0,22

**M<sub>w</sub>** - massa molar média em massa, **Đ** = M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> - dispersão **[η]** - viscosidade intrínseca, **R<sub>g</sub>\*\*** - raio de giro obtido pela equação de Flory-Fox (**EQUAÇÃO 3**), **REC** – recuperação cromatográfica.

**ANEXO 2. CARACTERIZAÇÃO POR HPAEC DOS OLIGOSSACARÍDEOS HIDROLISADOS COM EGII 0,006 U.mL<sup>-1</sup> DE XG DAS SEMENTES DE TAMARINDO (XGT) E JATOBÁ (XGJ).**

<b>Tempo (min)</b>	<b>XXG</b>	<b>XXXG</b>	<b>XLXG</b>	<b>XXLG</b>	<b>XLLG+ XXXXG*</b>	<b>XXXLG</b>	<b>XLXXG</b>	<b>XXLXG</b>
<b>XGT</b>								
<b>10</b>	3,3	50,2	5,2	30,8	10,4	-	-	-
<b>30</b>	2,4	44,7	5,3	37,0	10,5	-	-	-
<b>60</b>	2,7	44,6	7,1	33,8	12,1	-	-	-
<b>90</b>	2,1	40,2	7,7	34,7	15,2	-	-	-
<b>120</b>	2,7	38,7	8,2	34,7	15,7	-	-	-
<b>140</b>	2,1	42,4	8,1	36,2	11,1	-	-	-
<b>XGJ</b>								
<b>10</b>	3,9	3,7	-	25,7	1,3	45,8	18,3	1,3
<b>30</b>	3,3	3,5	-	31,8	1,8	40,0	17,8	1,8
<b>60</b>	2,9	3,1	-	27,5	1,8	37,9	19,8	7,0
<b>90</b>	2,9	3,0	-	27,7	1,9	37,8	17,5	9,0
<b>120</b>	2,7	2,6	-	22,7	1,5	32,7	26,5	11,3
<b>140</b>	2,8	3,3	-	30,5	2,3	33,6	16,0	11,6

\*para XGJ a mistura de oligossacarídeos XLLG + XXXXG contém somente XLLG

**ANEXO 3. CARACTERIZAÇÃO POR HPAEC DOS OLIGOSSACARÍDEOS HIDROLISADOS COM EGII  $0,012 \text{ U.mL}^{-1}$  DE XG DAS SEMENTES DE TAMARINDO (XGT) E JATOBÁ (XGJ).**

<b>Tempo (min)</b>	<b>XXG</b>	<b>XXXG</b>	<b>XLXG</b>	<b>XXLG</b>	<b>XLLG+ XXXXG*</b>	<b>XXXLG</b>	<b>XLXXG</b>	<b>XXLXG</b>
<b>XGT</b>								
<b>10</b>	6,1	33,3	8,8	35,7	16,1	-	-	-
<b>30</b>	4,8	33,4	9,0	36,0	16,9	-	-	-
<b>60</b>	5,1	31,8	9,0	36,1	18,0	-	-	-
<b>90</b>	4,0	32,0	9,0	35,9	19,0	-	-	-
<b>120</b>	5,2	29,3	8,2	32,4	24,8	-	-	-
<b>140</b>	3,3	31,9	3,6	42,2	19,0	-	-	-
<b>XGJ</b>								
<b>10</b>	2,2	2,5	-	41,6	9,9	21,5	16,1	6,1
<b>30</b>	1,7	2,5	-	42,4	10,9	20,7	15,6	6,2
<b>60</b>	1,6	2,4	-	42,5	11,7	19,9	15,5	6,3
<b>90</b>	3,1	4,0	-	25,7	15,6	24,4	18,9	8,6
<b>120</b>	1,5	2,3	-	41,8	12,9	19,2	15,2	6,9
<b>140</b>	2,4	2,8	-	29,5	3,1	33,0	18,6	10,5

\*para XGJ a mistura de oligossacarídeos XLLG + XXXXG contém somente XLLG